UNTERSUCHUNG ZUM VERLAUF DER ABTÖTUNG VON S. AUREUS DURCH BENZALKONIUMCHLORID UND CHLORHEXIDINGLUCONAT UND ZUR KINETIK DER REGENERATION NACH INAKTIVIERUNG DER KONSERVIERUNGSMITTEL

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

URSULA WALLRAF-LOSCH
aus
KÖLN

BONN 1984

UNIV.
PENN
1891

UNTERSUCHUNG ZUM VERLAUF DER ABTÖTUNG VON S. AUREUS DURCH BENZALKONIUMCHLORID UND CHLORHEXIDINGLUCONAT UND ZUR KINETIK DER REGENERATION NACH INAKTIVIERUNG DER KONSERVIERUNGSMITTEL

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

URSULA WALLRAF-LOSCH
aus
KÖLN

BONN 1984

Angefertigt mit Genehmigung

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Bonn

1. Referent : Priv.-Doz. Dr. R. Süverkrüp

2. Referent : Prof. Dr. F. Müller

Tag der mündlichen Prüfung : 10. Februar 1984

Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn

Pharmazeutische Technologie

Direktor : Prof. Dr. F. Müller

Druck : Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Problemstellung 5

2. Literaturübersicht 7

2.1. Theorie 7
2.1.1. Vorgänge erster Ordnung 7
2.1.2. Lebenszyklus der Bakterien 9
2.1.3. Populationskinetik 11

2.2. Experimentelle Befunde 14
2.2.1. Abtötung von Keimen durch Konservierungsmittel 14
2.2.2. Wirkungsmechanismus von Konservierungsmitteln 15
2.2.3. Regeneration geschädigter Keime 17

3. Experimenteller Teil 19

3.1. Coulter Counter 19

3.2. Materialien 22
3.2.1. Testkeim 22
3.2.2. Konservierungsmittel 23
3.2.3. Nährmedien 25
3.2.4. Elektrolytlösung 27

3.3. Methoden 27
3.3.1. Übersicht 27
3.3.2. Keimzahlbestimmungen 29
3.3.2.1. Turbidimetrie 29
3.3.2.2. Coulter Counter 30
3.3.2.3. Plattengußverfahren 31
3.3.2.4. Übereinstimmung zwischen CC- und Plattendaten 32

3.4. Definition der Versuchsbedingungen 32

3.5. Versuche zur Wachstums- und Absterbekinetik von S.aur. 35
3.5.1. Versuchsablauf 35
3.5.2. Versuchsplan und Erläuterungen zur Auswertung 38

3.6. Ergebnisse 41
3.6.1. Temperatureinfluß auf Wachstum und Absterben von S. aureus 42
3.6.2. Absterben und Regeneration von S.aureus unter Konservierungsmitteleinfluß 43
3.6.2.1. Benzalkoniumchlorid 43
3.6.2.2. Chlorhexidingluconat 60

4. Auswertung 72
4.1. Unterschiede zwischen den Messverfahren 72
4.2. Kinetische Modelle mit Übergängen erster Ordnung 73
4.3. Verzögerungsmodell 81
4.4. Grundlagen zur Beurteilung der Kurvenanpassung 84
4.5. Vergleich der Modelle I bis III 89
4.5.1. Benzalkoniumchlorid 90
4.5.2. Chlorhexidingluconat 97
4.6. Vergleich der Wirkungsintensität von BAC und CHG 100
4.7. Verzögerungszeiten 103

5. Diskussion 106
5.1. Kinetische Modelle 107
5.2. Absterbekinetik 108

6. Zusammenfassung 110

7. Anhang 112
A : Laplace-Transformation der Gl. 4-21 bis 4-23 112
B : Ableitung der Gleichung zur Berechnung von $t_{1\%}$ 116
C : Statistische Daten der Kurvenanpassung für die Modelle I bis III 119
D : Symbole 121
E : EDV-Programme 124

8. Literaturverzeichnis 139

1. PROBLEMSTELLUNG

Mikrobiell verunreinigte Medikamente können gesundheitliche Beeinträchtigungen hervorrufen. Besonders groß ist die Gefahr bei Augenarzneimitteln, vor allem am verletzten Auge (1,2). Das DAB 8 (3) verlangt deshalb, daß Augentropfen steril sein müssen und schreibt vor, daß sie durch Sterilisation oder Entkeimungsfiltration keimfrei gemacht oder unter aseptischen Bedingungen hergestellt werden. Augentropfen in Mehrdosenbehältern werden konserviert, um Rekontamination zu verhindern.

Meist bevorzugt man zur Sterilisation die Behandlung mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf bei 121°C und 2 bar für 20 Minuten. Dieses Verfahren ist für thermolabile Wirkstoffe und Verpackungsmaterialien nicht geeignet. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Sterilität durch kombinierte thermische und chemische Schädigung von Mikroorganismen erreicht werden kann, ohne die Stabilität des Arzneimittels zu gefährden.

Einen Schritt in diese Richtung ging die BP bereits 1973, indem sie eine Sterilisation durch Erwärmung in Gegenwart von einem Konservierungsmittel zuläßt (4). Die Lösung oder Suspension, die 2 mg/ml Chlorkresol bzw 2 µg/ml Phenylquecksilbernitrat enthält, wird 30 Minuten bei nur 98 - 100°C gehalten. Nach Richards et al. führt dieses Verfahren nicht in jedem Fall zur Sterilität, wie die Autoren an P.aerug. zeigten (5,6,7). Der Erfolg einer derartigen Behandlung hängt sehr stark vom verwendeten Keim bzw. Stamm ab.

Der Einfluß der Faktoren Temperatur und Konservierungsmittelkonzentration sollte in einem Faktorenversuch auf mehreren Niveaus variiert und die Abhängigkeit der Absterbekinetik von den Versuchsvariablen innerhalb eines möglichst weiten Bereiches untersucht werden.

Um nicht von einem Verfahren abhängig zu sein, sollte neben der klassischen Plattengußmethode, bei der die Anzahl koloniebildender Einheiten gezählt wird, die Teilchenzählung mit dem Coulter Counter verwendet werden, bei der jede Zelle erfaßt wird.

Während der Versuchsplan beibehalten werden konnte, mußte der Schwerpunkt der Auswertung verschoben werden. Eine verzögerte Regeneration der Mikroorganismen führte zu deutlichen Abweichungen zwischen einander entsprechenden Werten, die nach der Plattenguß- und nach der Coulter Counter-Methode erhalten wurden. Deshalb wurde die Anfangsphase der Regeneration nach der Plattenmethode intensiver untersucht und anschließend versucht, den Verlauf der Regeneration mit Hilfe von kinetischen Modellen zu interpretieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Theorie

2.1.1. Vorgänge erster Ordnung

Das Wachstum und die Abtötung von Mikroorganismen gehorchen unter gewissen Bedingungen einfachen Gesetzmäßigkeiten, die auch in anderen Wissenschaftsbereichen gelten.
Wenn sich in kurzen Zeitintervallen gleicher Dauer jeweils ein bestimmter Anteil der Keime teilt, so spricht man von logarithmischem Wachstum, für das die Zinseszinsformel gilt. Stirbt dagegen im gleichen Zeitraum jeweils ein bestimmter Anteil der Organismen ab, so entspricht die exponentielle Abnahme formal dem Gesetz des radioaktiven Isotopenzerfalls.
In beiden Fällen spricht man von Vorgängen erster Ordnung. Die Geschwindigkeit, mit der sich eine Größe ändert, ist dabei dem momentanen Wert der Größe proportional.
Die entsprechende Differentialgleichung lautet für den Wachstumsvorgang :

$$\frac{dN}{dt} = k\,N \qquad \text{Gl. 2-1}$$

und für das Absterben bzw Zerfalls- und Zersetzungsreaktionen :

$$\frac{dN}{dt} = -k\,N \qquad \text{Gl. 2-2}$$

Durch Integration kommt man zu :

$$N = N_0\, e^{k\,t} \qquad \text{Gl. 2-1.a}$$

bzw :

$$N = N_0 \, e^{-k t} \qquad \text{Gl. 2-2.a}$$

Die Geschwindigkeitskonstante hat die Einheit Zeit^{-1} und kann aus der halblogarithmischen graphischen Darstellung entnommen werden. Durch Logarithmieren geht 2-1.a in

$$\log N = \log N_0 + \frac{k\,t}{2.303} \qquad \text{Gl. 2-1.b}$$

über. Trägt man log N gegen t auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung :

$$m = \frac{k}{2.303} \qquad \text{Gl. 2-3}$$

Entsprechend ist die Steigung bei Absterbevorgängen :

$$m = -\frac{k}{2.303} \qquad \text{Gl. 2-4}$$

Anschaulichere Maßzahlen sind für das Wachstum die Verdoppelungs- oder Generationszeit :

$$t_2 = \frac{\ln 2}{k} \qquad \text{Gl. 2-5}$$

und für das Absterben die Halbwertszeit :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \qquad \text{Gl. 2-5.a}$$

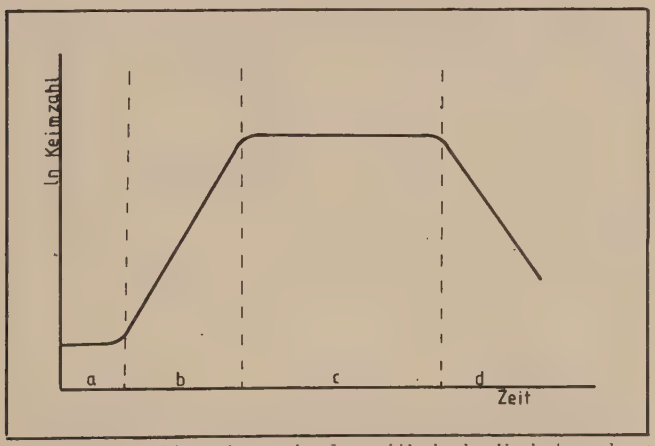
sowie die dezimale Keimreduktion (D-Wert) , d.h. die Zeit

$$t_{0.1} = \frac{\ln 10}{k} \quad , \qquad \text{Gl. 2-6}$$

in der die Keimzahl auf 10% des Ausgangswertes reduziert wird.

2.1.2. Lebenszyklus der Bakterien

In mikrobiologischen Arbeiten wird die Kinetik des Wachstums und Absterbens von Bakterien überwiegend verbal bzw. tabellarisch oder als einfacher Prozess erster Ordnung dargestellt. Die Interpretation der zeitlichen Veränderung von Kennzahlen mit Hilfe von kinetischen Modellen, wie sie von Feldmann (8,9) beschrieben werden, wurde bislang selten versucht.
Wird das Wachstum einer frisch angelegten Mikrobenkultur kontinuierlich überprüft, so resultiert der in Abbildung 2-1 dargestellte typische Wachstumsverlauf.



a: Regenerationsphase b: logarithmische Wachstumsphase
c: stationäre Phase d: Absterbephase

Abb. 2-1 Lebenszyklus einer Bakterienkultur (nach Wiesmann (61))

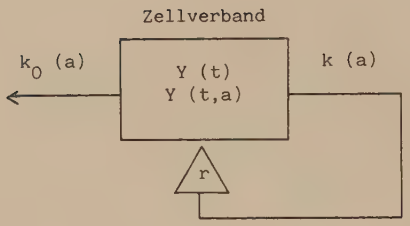
Während der Regenerations- oder auch 'lag'-Phase passen sich die Keime den veränderten Bedingungen an. Ihre Dauer ist von der Entwicklungsgeschichte der Impfkeime abhängig. Stammen sie aus einem Medium, in dem günstige Bedingungen vorlagen, so ist das Zeitintervall bis zum Beginn der Zellteilung normalerweise kurz, vorausgesetzt, daß sich die Kulturbedingungen nicht deutlich ändern.
Die Adaptation dauert länger, wenn die Anzucht der Keime unter ungünstigen Verhältnissen erfolgte. Verarmung an Nährstoffen, Anwesenheit von antibakteriellen Substanzen, hohe Elektrolytkonzentration und Temperaturen außerhalb des optimalen Wachstumsbereiches können den Beginn des Wachstums verzögern.
Hat sich die Kultur den Bedingungen angepaßt, so teilen sich alle Keime in ungefähr gleichen Zeitabständen. Dadurch verdoppelt sich die Keimzahl in konstanten Intervallen und das Wachstum entspricht einem Vorgang erster Ordnung, der im halblogarithmischen System als Gerade dargestellt wird. Diese Phase bezeichnet man deshalb als logarithmisches Wachstum. Die Verdoppelungszeit und damit die Wachstumsgeschwindigkeitskonstante sind unter gegebenen Bedingungen für den verwendeten Stamm reproduzierbar.
Wenn das Medium bei hoher Keimzahl an Nährstoffen verarmt und die Konzentration der Stoffwechselprodukte zunimmt, geht die Kultur in einen stationären Zustand über, in dem einige Keime bereits absterben, während andere sich noch teilen.
Schließlich verschlechtern sich die Lebensbedingungen so weit, daß jegliches Wachstum aufhört und die Lebendkeimzahl zurückgeht.

2.1.3. Populationskinetik

Kinetische Methoden wurden von der Arbeitsgruppe von Garrett (10 - 33) bei der Untersuchung des Einflusses antimikrobiell wirksamer Substanzen auf das Wachstum und auf das Absterben von Mikroorganismen angewendet. Dabei standen die Interpretation experimenteller Befunde und mögliche Konsequenzen für die Therapie im Vordergrund.
Aufbauend auf der Theorie linearer Kompartimentmodelle, wie sie in der Pharmakokinetik angewendet werden (8,35,36), entwickelte Feldmann (9) populationskinetische Modelle für das Verhalten von Bakterienkulturen. Er unterscheidet deskriptive von interpretativen Modellen und führt dazu aus (9, S.3) :

> Will man ... Messungen am biologischen System möglichst genau durch Berechnungen am Modell wiedergeben, dann genügen deskriptive Modelle, wie sie etwa die multiple lineare Regressionsanalyse bietet, ... Soll darüber hinaus das biologische Geschehen interpretiert werden, dann müssen den Modellparametern entsprechende physiologische Kenngrößen des biologischen Systems zugeordnet sein. Beispiele solcher interpretativen Modelle finden sich etwa in der Pharmakokinetik, in denen die Parameter als relative Invasions- oder Eliminationsgeschwindigkeiten angesehen werden.

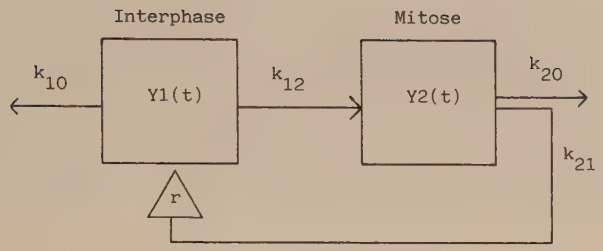
Sein Ziel ist, mit Hilfe möglichst einfacher, biologisch sinnvoller Modelle, eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Beobachtung zu erreichen. Dabei dient das Modell als Interpretationshilfe und kann gleichzeitig zur Simulation des biologischen Systems unter Bedingungen benutzt werden, die u.U. experimentell nicht mehr zugänglich sind.
Im folgenden Abschnitt sollen zwei Modelle von Feldmann beschrieben werden. In der Abbildung 2-2 ist als einfachste Darstellung das Ein-Kompartiment-Modell des Zellzyklus gegeben.



t	absolute Zeit	a	Alter
Y(t,a)	Altersdichte	Y(t)	Gesamtzahl der Zellen zur Zeit t
r	Reproduktion	k(a)	Generationsrate
k_0(a)	Mortalitätsrate		

Abb. 2-2 Grundmodell des Zellzyklus nach Feldmann (9, S.6)

Der Zellverband Y(t) besitzt hier Eigenschaften, die in der Pharmakokinetik Kompartimenten zukommen.
Kennzeichnend für den Verband ist die Altersverteilung seiner Zellen. Bei der Teilung verläßt eine ältere Zelle den Verband, und im einfachsten Fall treten zwei junge Zellen des Alters Null an ihre Stelle. Außer durch Teilung verläßt eine Zelle den Verband durch Tod.
Überleben beide Tochterzellen und stirbt kein Organismus in der Mitte des Lebenszyklus, so wächst die Kultur exponentiell mit maximaler Geschwindigkeit.
Wenn im Mittel mehr als eine Tochterzelle überlebt und der Überschuß auch nicht durch Absterben außerhalb der Mitosephase aufgehoben wird, so wächst die Kultur.
Wenn pro Zeiteinheit ebenso viele Keime neu entstehen, wie inner- und außerhalb der Mitose absterben, stagniert die Keimzahl.
Resultiert aus jeder Teilung weniger als eine Tochterzelle oder wird die Bilanz durch eine hohe Todesrate in der Interphase verschoben, so stirbt die Kultur.
Im Rahmen dieses Modelltyps können Interphase und Mitose auch getrennt betrachtet werden. Feldmann spricht dann vom Interphasenmodell (s. Abb. 2-3).



$k_{i\,j}$ Übergangsrate vom i-ten Kompartiment in das j-te
$k_{i\,0}$ Übergangsrate vom i-ten Kompartiment in das Systemäußere
r Reproduktion
$Y_i(t)$ Gesamtzahl der Zellen zur Zeit t im i-ten Kompartiment

Abb. 2-3 Interphasenmodell nach Feldmann (9, S.7)

Die Zellen der Interphase können in Abhängigkeit von Alter und Umweltfaktoren in die Mitose übergehen, oder sie sterben. Das Kompartiment der Mitose verlassen diese Zellen durch den Tod oder Replikation und erneuten Eintritt in die Interphase. Die Änderung der Zellzahl in den Kompartimenten kann wie folgt beschrieben werden :

Interphase

$$\frac{dY1}{dt} = -(k_{12} + k_{10})\,Y1 + r\,k_{21}\,Y2 \qquad \text{Gl. 2-7}$$

Mitose

$$\frac{dY2}{dt} = -(k_{21} + k_{20})\,Y2 + r\,k_{12}\,Y2 \qquad \text{Gl. 2-8}$$

Änderung = Verlust + Zunahme

Diese Differentialgleichungen definieren die Veränderung der Zellzahl in den entsprechenden Kompartimenten.

Wird die Methodik weiter verfeinert, kann die Mitose in ihre Subphasen - Pro-, Meta-, Ana-, Telophase - aufgetrennt werden. Das führt dann zu komplizierten Vier- und Mehr-Kompartiment-Modellen, deren praktische Bedeutung nicht gesichert ist.
Nach diesem Vorbild wurden eigene Modelle zur Interpretation der Konservierungsmittelwirkung entwickelt.

2.2. Experimentelle Befunde

2.2.1. Abtötung von Keimen durch Konservierungsmittel

Bei den antibakteriell wirksamen Substanzen kann man zwei große Gruppen unterscheiden : Antibiotika und Chemotherapeutika, die zur Behandlung von Infektionskrankheiten dienen, sowie Konservierungs- und Desinfektionsmittel, die zur Abtötung von Keimen in Arznei- und Lebensmitteln oder auf Oberflächen verwendet werden.
Kinetische Untersuchungen der Wachstumshemmung und Abtötung von E.coli durch verschiedene Antibiotika und Chemotherapeutika wurden von Garrett und Mitarbeitern veröffentlicht (10 - 33). Dabei wurde wie in dieser Arbeit neben dem Plattenverfahren die Coulter Counter Technik zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl eingesetzt. Die Autoren beobachteten in der Regel die Veränderung der Keimzahl unter direktem Einfluß der antibakteriell wirksamen Substanz.
Darauf aufbauend versuchte Seydel (34), den Coulter Counter auch zur Bestimmung der Lebendkeimzahl einzusetzen, indem er nach Beendigung der Konservierungsmittelwirkung durch Verdünnung die Wachstumskurven zum Zeitpunkt Null zurückextrapolierte. Dabei wurden zum Beispiel bei Tetracyclin Ergebnisse gefunden, die sich von denen der Plattenmethode deutlich unterschieden.
Obwohl Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Wirkung von Konservierungsmitteln vorliegen, wurden die Daten bisher kaum unter kinetischen Gesichtspunkten ausgewertet. Ein Beispiel für die klassischen Untersuchungsmethoden, bei denen eine kinetische Interpretation nicht möglich ist, stammt von Hugo und Forster (37). Sie bestimmten an P. aeruginosa die minimalen Konzentrationen verschie-

dener Konservierungsmittel, die erforderlich waren, um die Keimzahl von 10 - 100 Organismen/ml in 30 Minuten auf Null zu reduzieren. Dabei berücksichtigten sie auch den Einfluß der Temperatur.
Bean (38) stellte 1972 in einer Übersichtsarbeit einfache Gesetzmäßigkeiten der Populationskinetik von Mikroorganismen unter dem Einfluß von Konservierungsmitteln zusammen. Seine Darstellung ist aber eher theoretisch angelegt und geht auf experimentelle Befunde nur am Rande ein.
In einer vergleichenden Untersuchung verschiedener Konservierungsmittel für Augentropfen untersuchte Davies (39) den Einfluß von Temperatur, pH-Wert, Konzentration und Ausgangskeimzahl auf den Verlauf des Absterbens, wertete seine Daten aber nicht kinetisch aus. Das gleiche gilt für Elkhouly und Yousef (40), die 1974 die Abtötung von P. aeruginosa und S. aureus durch Quecksilberverbindungen beobachteten und dabei besonders die Inaktivierung durch Natriumthiosulfat berücksichtigten.
Freke und Haggie (41) untersuchten 1981 an einem besonders resistenten Stamm von S. aureus den Einfluß der Temperatur auf die Wirksamkeit von 400 mg/ml Benzalkoniumchlorid. Dabei beobachteten sie den Verlauf des Absterbens nur in einem Punkt, in dem sie die Verringerung der Keimzahl innerhalb der ersten 60 Sekunden nach Zugabe bestimmten.

2.2.2. Wirkungsmechanismus von Konservierungsmitteln

Die Mikroorganismen werden durch oberflächenaktive Substanzen auf unterschiedliche Art und Weise geschädigt. Die Angriffspunkte sind abhängig von Konzentration und Einwirkungsdauer. Bei niedrigen Konzentrationen steht allgemein eine Änderung der Permeabilität der Zellmembran im Vordergrund, die zum Austritt von niedermolekularen Substanzen und Elektrolyten führt. Diese Funktionsstörungen sind reversibel, wenn sie nicht zu stark sind und zu lange andauern. Bei einigen Konservierungsmitteln, zum Beispiel Chlorhexidin, ist in

diesem Konzentrationsbereich auch eine Hemmung der Membran-ATPase zu beobachten (42,43). Durch Auswaschen oder Inaktivierung des Konservierungsmittels kann eine Enzymhemmung rückgängig gemacht werden (44 - 47).

Bei höherer Konzentration und längerer Einwirkungsdauer wird die Membran stärker geschädigt, und man beobachtet den Austritt von Cytoplasma. Konservierungsmittel, das in die Zelle gelangt, kann dort autolytische Enzyme freisetzen. Beide Vorgänge führen dazu, daß die Zelle ihre Funktionstüchtigkeit irreversibel verliert (48).

Bei sehr hohen Konzentrationen werden die Zellproteine (42,48) koaguliert.

Der Verlust an niedermolekularem Zellmaterial durch die geschädigte Membran wird durch physikalische und chemische Analysenmethoden nachgewiesen. Das erste Anzeichen der Schädigung ist der Austritt von Kalium, Natrium und Magnesium aus dem Zellinnern. Dieser kann durch ionenselektive Elektroden oder durch direkte Messung des Membranpotentials nachgewiesen werden (42,48).

Als Ursache des Membranpotentialzusammenbruches kommt auch eine Schädigung der Transportmechanismen in Frage. Zur Untersuchung von Enzymhemmungen werden auch biochemische Verfahren verwendet. Die Sauerstoffaufnahme der Zelle kann in der Warburgapparatur manometrisch verfolgt werden. Auf diesem Wege wies Wiseman (43) 1964 nach, daß Chlorhexidin das Cytochromsystem hemmt. Gleichzeitig konnte er zeigen, daß die Succinylhydrogenase, die dabei als Elektronenakzeptor dient, nicht geschädigt wird, weil sie noch in der Lage ist, Ferricyanid zu reduzieren. Die Hemmung metabolischer Enzyme kann auch dadurch nachgewiesen werden, daß man den Einbau radioaktiv markierter Substrate verfolgt.

Ein anschauliches Bild von Membranschäden und autolytischen Prozessen liefert die Elektronenmikroskopie, wie Richards et al. an verschiedenen Studien zeigen (49 - 51).

Ein Indiz für autolytische Prozesse ist der Rückgang der photometrischen Extinktion zwischen 420 und 470 nm (52).

Unter den oberflächenaktiven Konservierungsmitteln zeichnen sich kationische Verbindungen, zum Beispiel quartäre Ammoniumbasen und Chlorhexidin, durch ihre hohe Aktivität aus. Dazu trägt möglicherweise eine Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Stickstoffatomen und den negativ geladenen Carboxyl- und Phosphatgruppen der Cytoplasmamembran bei (53).
Die Wirksamkeit hängt ebenfalls von der Länge der unpolaren Molekülteile ab. Für quartäre Ammoniumverbindungen fand Domagk (54) 1937 ein Wirkungsoptimum bei einer Kettenlänge von 12 bis 16 C-Atomen.

2.2.3. Regeneration geschädigter Keime

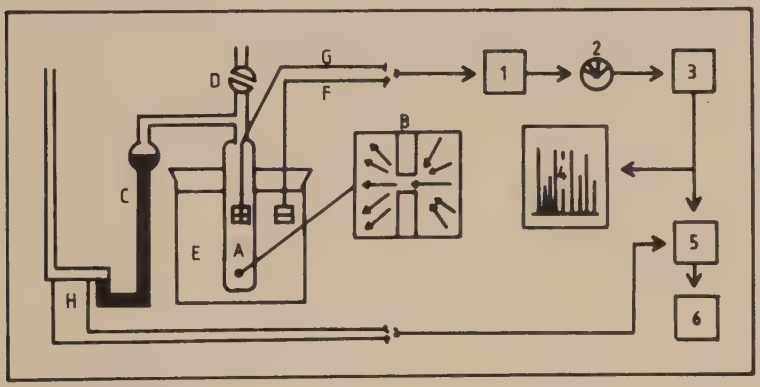
Die Regeneration von thermisch geschädigten Keimen ist vor allem in der Nahrungsmittelindustrie von erheblicher praktischer Bedeutung und relativ häufig untersucht worden. Durch die Auswahl von geeigneten Anzuchtbedingungen kann man zwischen gesunden, geschädigten und abgetöteten Organismen unterscheiden.
So verliert S.aureus nach Schädigung die Fähigkeit, in Medien zu zu wachsen, die eine hohe Elektrolytkonzentration aufweisen. Deshalb vertreten Jandolo und Ordal (55) die Auffassung, daß nur intakte S.aureus in Normalmedien und Nährbouillons mit 7,5% Natriumchloridgehalt wachsen, während Organismen, deren Funktionstüchtigkeit eingeschränkt ist, sich nur in Normalmedien vermehren. Gewinnen geschädigte Keime die Fähigkeit zurück, in Medien mit hohem Elektrolytgehalt zu wachsen, so ist das ein Hinweis auf die Reparatur der Membranschäden.
Bei Veränderungen der Membran, die durch Konservierungsmittel hervorgerufen wurden, hängt die Regeneration von den Kulturbedingungen ab, wie Nadir und Gilbert an B. megaterium nach Behandlung mit Chlorhexidin nachweisen konnten (56). Sie beobachteten, daß die KCl-Toleranz der Mikroorganismen auch in Gegenwart von Inhibitoren der Protein-, DNA- und RNA-Biosynthese wieder zurückkehrt und nicht von der Atmung abhängig ist.

Nicht immer aber bieten Medien mit vollständigen und reichhaltigen Nährsubstraten optimale Regenerationsbedingungen, wie Hurst et al. (57,58) 1976 und 1973 an wärmegeschädigten S. aureus beobachteten. Neben der Zusammensetzung des Nährmediums ist die Temperatur für die Wiederanzucht von Bedeutung. B. subtilis und C. botulinum wachsen normalerweise in einem breiten Temperaturintervall. Nach der Behandlung mit Wärme bzw UV-Strahlen wird dieses Intervall relativ schmal, wie Prentice und Clegg (59) sowie Chowdhury et al. (60) zeigten.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Coulter Counter

Mit dem Coulter Counter* (CC) werden Partikelzahl und - größe von Suspensionen konduktometrisch bestimmt. Für diese Arbeit stand das Modell ZB zur Verfügung. Der schematische Aufbau des Gerätes ist in Abbildung 3-1 wiedergegeben.
In einem Becher (E) wird die zu vermessende Probe in einer geeigneten Elektrolytlösung (s. Abschnitt 3.2.4.) suspendiert und eine Elektrode (F) in die Suspension eingebracht. Das Zählrohr (A) taucht so tief in das Gefäß ein, daß die in der Wandung befindliche Kapillare (B) bedeckt ist.



1 Hauptverstärker
2 untere Schwellengrenze
3 Impulsverstärker
4 Oszillograph
5 Zählwerk
6 Digitalanzeiger

Abb. 3-1 Aufbau des Coulter Counters Modell ZB

*Coulter Electronics, Coldharbor Lane, Harpenden, Hertfortshire, GB

Der Kapillardurchmesser muß der erwarteten Partikelgröße angepaßt werden. Sie soll mindestens 2 und höchstens 40 % der lichten Weite betragen. Für S.aureus mit einem mittleren Durchmesser von 1 µm (61) wurde eine Öffnung von 30 µm verwendet.
Das Zählrohr, in dem sich eine zweite Elektrode (G) befindet, wird luftblasenfrei mit der zur Suspendierung verwendeten Elektrolytlösung gefüllt.
Durch Öffnen des Hahnes (D) wird über eine Pumpe ein Vakuum im Zählrohr angelegt. Dadurch wird die Quecksilbersäule (C) so weit verschoben, daß ihr unteres Ende die Kontakte (H) nicht mehr berührt.
Beim Schließen des Hahnes strebt die Quecksilbersäule der Gleichgewichtslage zu und saugt einen Teil der Suspension durch die Kapillare in das Zählrohr.
Der elektrische Widerstand von Feststoffen und Zellen übersteigt den der Elektrolytlösung. Durchquert daher ein Partikel den Engpaß, so erhöht sich der bestehende Widerstand um den Partikelwiderstand und es entsteht ein Impuls, der dem Volumen des Teilchens proportional ist (s. Gleichung 3-1). Die Impulse werden elektronisch verstärkt und gezählt. Signale außerhalb des gewünschten Meßbereiches können über eine elektronische Schaltung ausgeschlossen werden.
Für die Höhe des Impulses der kleinsten, erfaßbaren Partikel gilt (62) :

$$V = t_L \; I \; 1 / A \; . \qquad \text{Gl. 3-1}$$

V	Höhe des Spannungsimpulses	[Volt]
t_L	untere Schwellengrenze	[Ohm]
I	Stromstärke	[mA]
A	Verstärkung	

Werden Partikel von bekanntem Durchmesser zur Eichung verwendet, kann aus den Impulshöhen der Kalibrierungsfaktor KF bestimmt werden. Mit seiner Hilfe wird der Durchmesser volumengleicher kugelförmiger Partikel aus der Höhe des Spannungsimpulses ermittelt (62) :

$$d = KF \sqrt[3]{V} \qquad \text{Gl. 3-2}$$

d Durchmesser [µm]
KF Kalibrierungsfaktor [µm / Volt]
V Höhe des Spannungsimpulses [Volt]

Die Impulsintensität kann nach Verstärkung und Wahl der Schwellenwerte auf dem Oszillographen beobachtet werden. Das jeweilige Erscheinungsbild erlaubt auch die Diagnose von Störungsursachen. Dazu zählen Verstopfung der Kapillare, elektrische Interferenzen und Luftbläschen.
Für die Messungen wurde ein Probevolumen von 0.05 ml gewählt, um eine kurze Meßdauer zu erreichen und die Meßwerte möglichst klein zu halten. Das Volumen der Quecksilbersäule zwischen einem festen Start- und dem gewählten Endkontakt entspricht dem Probevolumen. Passiert nach Unterbrechung des Vakuums das Quecksilber den Startpunkt, so beginnt die Partikelzählung. Bei Erreichen des zweiten Kontaktes wird sie abgebrochen.
Damit der Blindwert durch kleinste Partikel, die bei der Sterilfiltration in der Elektrolytlösung verbleiben, und extern bedingte Störungen (Leuchtstoffröhren, elektrische Geräte) nicht zu hoch ausfällt, ist ein großer unterer Schwellenwert sinnvoll.
Die maximale Stromstärke liegt bei 1 mA (63). Bei höheren Werten wird das Medium durch den Widerstand der kleinen Kapillare zu stark aufgeheizt. Auch eine direkte Keimschädigung durch hohen Stromfluß ist möglich.
Weil die Partikel für die Kapillare relativ klein waren, mußte die erforderliche hohe Auflösung über die maximale Verstärkung erreicht werden. Bei einem Kalibrierungsfaktor von durchschnittlich 0.56 und einem Widerstand von 20 Ohm ergab sich die Geräteeinstellung wie folgt :

Stromstärke	0.5 mA
Verstärkung	8
unterer Schwellenwert	46 Ohm
oberer Schwellenwert	110 Ohm

Entsprechend den Gleichungen 3-1 und 3-2 liegt damit der kleinste erfaßbare Partikeldurchmesser bei 0.79 µm. Bei Kontrollversuchen wurde mit dieser Einstellung eine gute Übereinstimmung zwischen der Plattengußmethode und der CC-Messung erhalten (s. Abschnitt 3.3.2.4.).
Bei den Meßdaten muß eine Koinzidenzkorrektur durchgeführt werden. Für eine 30 µm Kapillare wird folgende Gleichung angegeben (62) :

$$N'' = 0.675 \left(\frac{N'}{1000} \right)^2 + N' \qquad \text{Gl. 3-3}$$

N'' korrigierte Keimzahl
N' Meßwert

Die Gleichung 3-3 gilt bei den gegebenen Bedingungen bis zu einer maximalen Partikelzahl von 150.000 / 0.05 ml. Diese Grenze wurde nicht ausgenutzt, da die Keimzahlen in der Regel zwischen 900 und 20.000 pro Messung lagen. Der Blindwert der reinen Elektrolytlösung betrug meist 4 bis 50 Impulse, unter ungünstigen Umständen stieg er bis auf 120 an. Die Proben, die mehr als 500 Partikel / Messung ergaben, wurden zweimal vermessen. Bei Mehrfachbestimmungen wurden in der Regel Differenzen um 1 % registriert. In keinem Fall lagen sie über 2 %.

3.2. Materialien

3.2.1. Testkeim

Als Testkeim wurde S. aureus ATCC 6538* verwendet. Dieser Stamm wird von der USP XX als Vergleichskeim zum Nachweis der Abwesenheit von S. aureus verwendet.
Der Keim ist relativ resistent (61) und mesophil, d.h., seine optimale Wachstumstemperatur liegt im Bereich der Körpertemperatur. S.aureus ist relativ anspruchslos und seine Kultivierung ist einfach (65). Die Neigung zur Bildung von Agglomeraten wurde durch

*American Type Culture Collection, Rockville, MD

Zusatz von Tween 80 zum Kulturmedium unterbunden und damit eine Keimzahlbestimmung im CC ermöglicht (66).
Das Bakterium gehört zu den Kokken, ist gram-positiv, hat einen mittleren Durchmesser von 1 µm bei kugeliger Gestalt (61).
S. aureus ist im untersuchten Zusammenhang nicht nur von akademischen Interesse, da er fakultativ pathogen ist und zu den wichtigsten Eitererregern gehört (61). Am Auge ruft er schwerwiegende Infektionen hervor. Diese reichen von komplizierten Lidrandentzündungen bis zum eitrigen Geschwür (1,2).

Die Keime wurden auf N1-Standardnähragar (E.Merck, Darmstadt) gezüchtet und aufbewahrt. Um einen gleichbleibenden physiologischen Status zu erhalten, wurde jeden Tag eine neue Kultur angelegt. Diese kam für 24 Stunden in den Inkubator bei 37.5°C und diente als Ausgangsmaterial für Versuchsansätze und neue Agarkulturen.
Form, Farbe und Größe der Kolonien wurden visuell überprüft und Kulturen, die abweichendes Wachstum zeigten, verworfen.

3.2.2. Konservierungsmittel

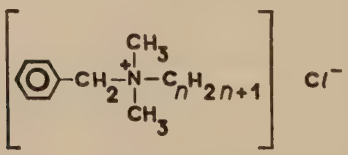
Benzalkoniumchlorid (BAC) und Chlorhexidingluconat (CHG) wurden aus den vom Deutschen Arzneimittel Codex (DAC) zur Augentropfenkonservierung zugelassenen Substanzen ausgewählt (s. Tabelle 3-1). Ihr Wirkungsoptimum liegt im physiologischen pH-Bereich und beide Verbindungen sind gut wasserlöslich. Gegenüber gram-positiven Keimen wirken sie in ausreichend hoher Konzentration bakterizid (65). Im Gegensatz zu den Phenylquecksilbersalzen (67) und Thiomersal (68) besteht keine Gefahr der Quecksilbereinlagerung in das Auge. Ein weiterer Nachteil von Thiomersal ist das unphysiologische Wirkungsoptimum im pH-Bereich unterhalb von pH 5 (65).

Tab. 3-1 Konservierungsmittelkonzentrationen verschiedener Arzneibücher g/100ml

Kons.Mittel	DAC	USPXX	BP 73	Ph.Helv.	DAB 2 DDR*
Benzalkoniumsalze	0.010	0.010	0.010	0.010	0.002
Chlorbutanol		0.500		0.500	
Chlorhexidinsalze	0.010		0.010		0.005
Phenyläthanol		0.500			
Phenylquecks.salze	0.002	0.002	0.002	0.004	0.002
Thiomersal	0.002				0.002

*Mindestkonzentration

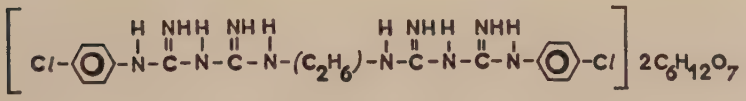
BAC* (s.Formel, mittleres MG 354 (67)) gehört zu den quartären Ammoniumsalzen. Unter allen Homologen sind C_{14}- und C_{18}-alkylsubstituierte Verbindungen die wirksamsten. Sie sind die Hauptbestandteile des Gemisches (69,70). So fordert die USP XX einen Gehalt an C_{12}- bis C_{14}-Alkylresten von mindestens 70 % (64).
Das Wirkungsoptimum von BAC liegt zwischen pH 5.5 und 10 (65). Mehrere Arzneibücher und der DAC empfehlen eine Konzentration von 0.01 g/100 ml (s. Tabelle 3-1). Gram-negative Keime können gegen die Substanz Resistenz ausbilden (65).



BAC (Alkyl-dimethyl-benzyl-ammonium-chlorid)

*Firma Synochem, Hamburg

CHG* (s. Formel, MG 897 (67)) ist ein kationenaktives Biguanidinderivat mit einem pH-Optimum zwischen pH 2 und 9 (65). Zur Konservierung werden 0.01 g/100ml empfohlen (s. Tabelle 3-1).



CHG (1,6-Bis-(4-chlorophenyl-diguanido)-hexan-digluconat)

Von den beiden Konservierungsmitteln wurden Stammlösungen hergestellt, deren Gehalt dem Hundertfachen der gewünschten Endkonzentration entsprach, und über Membranfilter keimfrei filtriert. Zur Aufbewahrung dienten braune, sterilisierte Glasflaschen, die mit partikelfreiem Wasser ausgespült worden waren.

3.2.3. Nährmedien

Für Plattenkulturen wurde N1-Standardnähragar, E.Merck, Darmstadt, verwendet. Dieser Agar kann universell eingesetzt werden.
Das gilt auch für die N1-Standardnährbouillon, E.Merck, Darmstadt. Dieses Medium diente zur Anzucht von S.aureus und zur Untersuchung des Einflusses von Konservierungsmitteln auf den Keim.
Zur Aufklärung der Keimregeneration wurden Anteile der konservierungsmittelgeschädigten Kulturen in Nortons Inaktivierungsbouillon (71) überimpft. Die Bouillon enthält mehrere Bestandteile, die die Wirkung von Konservierungsmitteln reduzieren oder aufheben.

*Firma Serva, Heidelberg

Inaktivierungsbouillon nach Norton :

		g
Tween 80, Merck-Schuchard, Hohenbrunn		3.9
Eilecithin, E.Merck, Darmstadt		0.2
Natriumthioglykolat, E.Merck, Darmstadt		0.1
Bacto Trypton, Difco, Detroit, USA		3.0
Wasser	ad	100.0

Die Tenside Tween 80 und Lecithin inaktivieren BAC und CHG durch Mizelleinschluß (72,73). Beide Zusätze trennen daneben noch Staphylococcen-Agglomerate (66). Nach Brown hat auch die Caseinpepton-Bouillon einen inaktivierenden Einfluß (74). Natriumthioglykolat bildet mit CHG und BAC antimikrobiell unwirksame Komplexverbindungen (65).
Trotz Inaktivierung der Konservierungsmittel starben zu Beginn der Regenerationsphase in einigen Fällen noch geschädigte Keime ab. Diese Erscheinung konnte auch bei dem Einsatz anders zusammengesetzter Medien nicht unterbunden werden. In diesen Versuchen wurde Nortons Bouillon ohne Thioglykolat und Thioglykolatbouillon (Merck, Darmstadt) eingesetzt. Thioglykolatbouillon enthält Hefe anstelle von Lecithin und Tween 80.

Der Agar wurde in 500- und 1000 ml-Gefässen autoklaviert (121°C, 2.1 bar, 20 Minuten, gespannter Wasserdampf) und nach dem Erstarren kühl aufbewahrt. Bei Bedarf wurde das Gel im Dampfdrucktopf bei 110°C verflüssigt und bis zum Ausgießen der Platten bei 50°C im Trockenschrank belassen.

Von den Bouillons wurden nach Filtration durch 0.2 µm Membranfilter mit 10- und 50 ml-Dispensetten* 4.5 ml in 10 ml-Reagenzgläser und 49.5 bzw 50.0 ml in 100 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben eingefüllt. Die Gefäße wurden mit Aluminiumfolie und Schutzkappen verschlossen autoklaviert und bis zum Gebrauch kühl aufbewahrt.

* Brand, Wertheim

3.2.4. Elektrolytlösung

Zur Teilchenzählung im Coulter Counter wurden Proben der Keimsuspension in 0.9 prozentige Natriumchloridlösung überimpft, der 0.35% Formaldehyd* zugesetzt wurden. Damit wurden die Keime vor Beginn der Messung abgetötet und das Kontaminationsrisiko für die Umgebung reduziert.

Die Elektrolytlösung wurde mit frisch destilliertem Wasser bereitet und zur Keim- und Partikelentfernung zweimal durch 0.2 µm Membranfilter gegeben.

3.3. Methoden

3.3.1. Übersicht

Bei der Untersuchung der Populationskinetik von S.aureus wurden drei Phasen des Lebenszyklus erfaßt : das logarithmische Wachstum vor Konservierungsmittelzugabe, das Absterben unter dem Einfluss der antibakteriellen Substanzen und die Regeneration nach der Schädigung.
In den Wachstumsphasen wurden die Gesamtkeimzahlen (GKZ) überschlägig turbidimetrisch und genau mit dem Coulter Counter in Abhängigkeit von der Zeit vermessen. Die Lebendkeimzahlen (LKZ) wurden nach dem Plattengußverfahren bestimmt. Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten, die aus den Coulter Counter- und Plattendaten bestimmt wurden, stimmten überein.
In einigen Vorversuchen wurde zwar auch die Absterbekinetik unter sprunghafter Änderung der Temperatur untersucht, in wesentlichen beschränkten sich die Untersuchungen aber auf den Verlauf der Abtötung der Keime durch Konservierungsmittel bei Temperaturen unterhalb der maximalen Wachstumstemperatur.

*Kertess, Hannover

Die Absterbekinetik kann mit Hilfe der Plattenmethode, mit der die Lebendkeimzahl bestimmt wird, direkt verfolgt werden. Das ist mit dem Coulter Counter nicht möglich, da diese Methode eine Differenzierung zwischen wachstumsgehemmten und abgetöteten Organismen nicht zuläßt.

Nach dem Überimpfen der Keime aus der konservierungsmittelhaltigen Suspension in Inaktivierungsmedium kann zumindest ein Teil der geschädigten Organismen seine Vermehrungsfähigkeit zurückgewinnen.

Die Plattenmethode liefert auch dann aussagekräftige Ergebnisse, wenn das Wachstum der Mikroorganismen erst mit einer deutlichen Verzögerung einsetzt.

Mit dem Coulter Counter bestimmt man die Ausgangskeimzahl zum Zeitpunkt des Überimpfens, indem man das logarithmische Wachstum in der Inaktivierungsbouillon zurückextrapoliert. Wenn die Keime verzögert anwachsen, ist die Interpretation schwierig.

Die Abbildung 3-2 zeigt eine Übersicht über einen vollständigen Versuch.

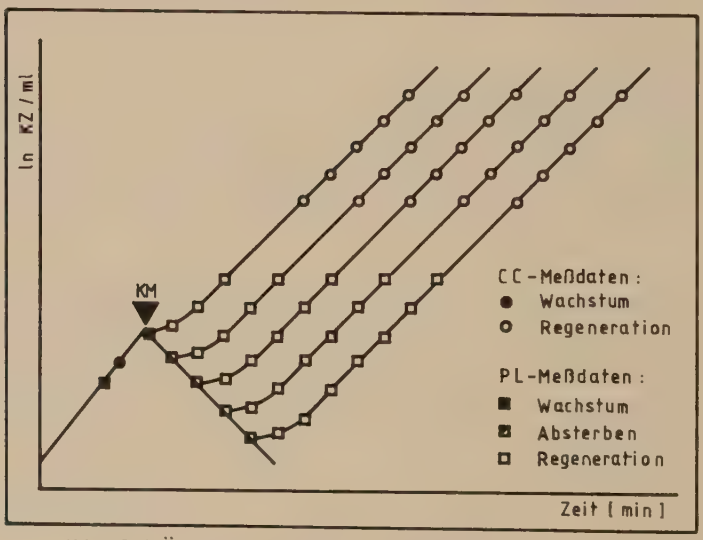


Abb. 3-2 Übersicht über den Verlauf eines Experimentes
KM : Konservierungsmittelzugabe

In der Versuchsplanung war für jedes Konservierungsmittel ein 3^2 Faktorenversuchsplan vorgesehen, um den Einfluß von Konzentration und Temperatur zu untersuchen und eine nichtlineare Abhängigkeit der Absterbegeschwindigkeitskonstante von den Versuchsvariablen auswerten zu können. Da die Kinetik der Regeneration sich als kompliziert und interessant erwies, verschob sich zwangsläufig der Schwerpunkt der Untersuchung.

3.3.2. Keimzahlbestimmungen

3.3.2.1. Turbidimetrie

Ab einer Keimzahl von $1x10^7$ Keimen / ml wird eine Suspension von S.aureus optisch trübe. Innerhalb eines engen Bereiches niedriger Extinktionen besteht eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Trübung und der Keimzahl.

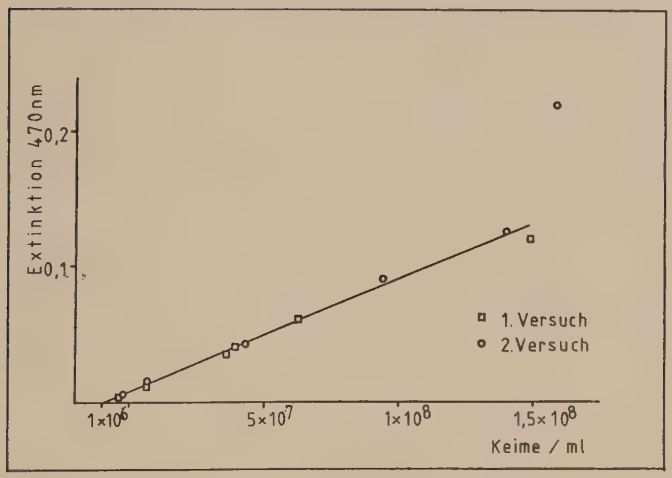


Abb. 3-3 Extinktion von S.aureus Kulturen in Abhängigkeit von der Keimzahl

Dieser Zusammenhang wurde ausgenutzt, um während der Anzuchtphase mit Hilfe einer Eichkurve die Gesamtkeimzahl überschlägig zu bestimmen (s.Abb. 3-3). Bei einer Keimzahl von ca $1x10^7$ (Extinktion 0.01 bei 470 nm) wurde 0.5 ml Keimsuspension (37.5°C) in frisches Medium von Versuchstemperatur überimpft.
Durch die relativ hohe Keimzahl wurden reproduzierbare Bedingungen sichergestellt.

3.3.2.2. Coulter Counter Messverfahren

Die Coulter Counter Methode ist ein Partikelzählverfahren. Daher ist sie nur zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl geeignet. Rückschlüsse auf die Lebendkeimzahl können unter gewissen Voraussetzungen bei Mehrfachmessungen aus der zeitlichen Zunahme der Organismenzahl gezogen werden.
Da eine Unterscheidung zwischen wachstumsgehemmten und abgetöten Bakterien nicht möglich ist, kann das Verfahren zur direkten Untersuchung der Absterbekinetik nicht verwendet werden. Indirekt kann man die Keimzahl unmittelbar nach dem Überimpfen erschließen, indem der Wachstumsverlauf in der Regenerationsphase zum Zeitpunkt des Überimpfens zurückextrapoliert wird. Das ist aber nur dann zulässig, wenn die Kultur in der Regenerationsbouillon ohne Verzögerung logarithmisch zu wachsen beginnt, anderenfalls werden zu niedrige Ausgangskeimzahlen ermittelt (vgl. Seydel, 34).
Bei jeder Messung sollten mindestens 500 Teilchen gezählt werden, das entspricht bei einem Probevolumen von 0.05 ml 10^4 Organismen in der Elektrolytlösung bzw. 10^5 Keimen / ml in der Nährbouillon bei einer Verdünnung von 1 : 10.
Die in den Tabellen angegebenen Meßwerte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

3.3.2.3. Plattengußverfahren

Mit der Plattenmethode kann die Lebendkeimzahl nach Inaktivierung antimikrobiell wirksamer Substanzen direkt bestimmt werden.
Den Keimsuspensionen wurden in regelmäßigen Zeitintervallen Proben von 0.5 ml entnommen und mit 4.5 ml Nährbouillon verdünnt. Diese relativ konzentrierten Suspensionen wurden in Stufen von 1:10 weiterverdünnt, bis die Keimzahl der letzten Verdünnung ca. 10 Organismen / ml betrug.
In einer sterilen Petrischale wurde 1.0 ml jeder Verdünnungsstufe mit 20 ml flüssigem Agar (45°C) gemischt. Nach dem Erstarren kamen die Platten für 48 Stunden zur Bebrütung in den Inkubator. Sie wurden umgedreht, um die Ansammlung von Kondenswasser auf dem Nährboden zu verhindern.
Die Zahl koloniebildender Einheiten (KBE) wurde mit einem Kontaktzählgerät bestimmt. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe wurde die Lebendkeimzahl zum Zeitpunkt der Probeziehung berechnet.
Nach Zimmermann (75) sind die Ergebnisse am zuverlässigsten, wenn der Nährboden mit 100 bis 300 Kolonien bewachsen ist. Wenn die Keimzahl niedriger ist, wird der Mischungsfehler zu groß. Bei hohen Keimzahlen behindern sich die Mikroorganismen gegenseitig und das Nährstoffangebot reicht nicht aus. Obwohl Bakterienzahlen, die außerhalb dieses Bereiches liegen, problematisch sind, wurden Ergebnisse zwischen 50 und 500 KBE ausgewertet.

3.3.2.4. Übereinstimmung zwischen CC- und Plattenmessdaten

Bei der Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten von unbelasteten Kulturen wurden CC- und Plattenmethode miteinander verglichen. Die Gesamtkeimzahlen lagen bei den Versuchen geringfügig über den Lebendkeimzahlen (s.Abb. 3-4). Die Wachstumsraten stimmten gut überein (s. Tabelle 4-1, Abschnitt 4.1).

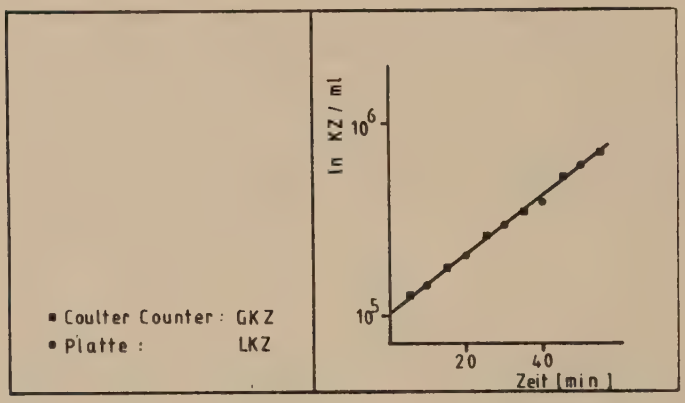


Abb. 3-4 Wachstum von S.aureus in N1-Bouillon bei 37.5°C

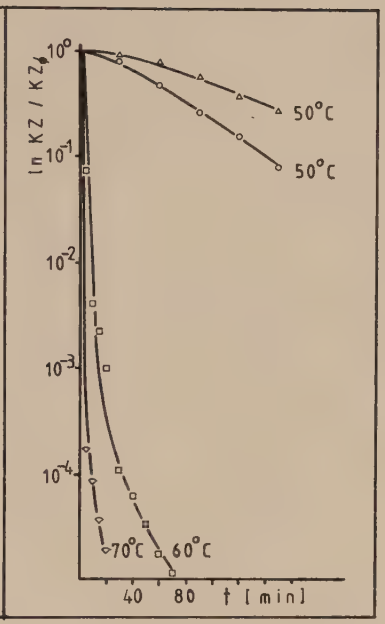
3.4. Definition der Versuchsbedingungen

Die Absterbekinetik von S.aureus in Bereichen oberhalb der maximalen Wachstumstemperatur sollte in Kombination mit Konservierungsmitteln untersucht werden.

Nach Anzucht bei 37.5 °C wurden die Kulturen erhöhten Temperaturen ausgesetzt und die Lebendkeimzahlen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Plattenmethode bestimmt.

Das Absterben verlief bei 70 und 60°C nicht monoexponentiell. Die Lebendkeimzahl wurde bei 70°C innerhalb von 5 Minuten und bei 60°C in 20 Minuten um 4 Zehnerpotenzen reduziert. Ein langsameres expo-

Abb. 3 - 5
Absterbekinetik von S.aureus in Abhängigkeit von der Temperatur



nentielles Absterben schloß sich an (s.Abb. 3-5).
Eine kinetische Untersuchung war nicht möglich, weil die experimentellen Bedingungen, vor allem die Frequenz der Probenziehung, eine exakte Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten nicht zuliessen. Vor allem die erste Abtötungsphase konnte in ihrem Verlauf nur unzureichend erfaßt werden (s.Abb. 3-5).
Eine Senkung der Temperatur auf 50°C ergab einen annähernd exponentiellen Verlauf des Absterbens, der nach kurzer Verzögerung beginnt.

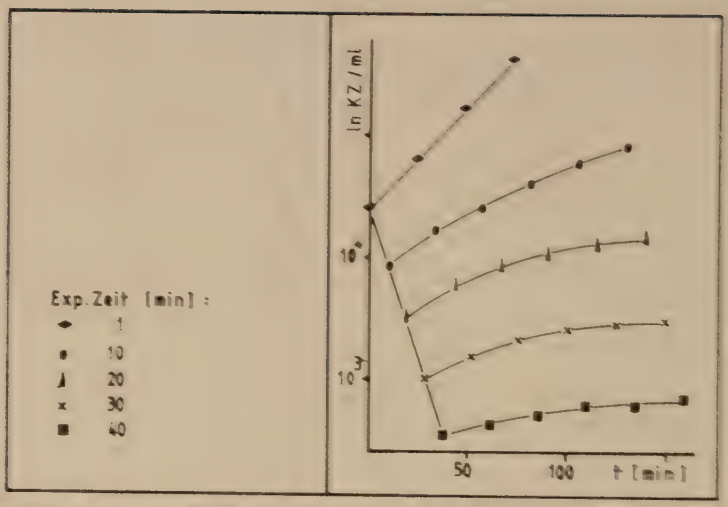


Abb.3-6 Anfangsphase der Regeneration von S.aureus nach thermischer Schädigung bei 50°C ohne Konservierungsmittelzusatz

Nach dieser thermischen Schädigung war aber die Regeneration der Mikroorganismen nicht auswertbar (s.Abb. 3-6), weil sich die Keime je nach Dauer der Schädigung zu Beginn noch langsam vermehrten, aber dann ihr Wachstum einstellten.

Um der Erfolg der Arbeit nicht durch diese technischen Schwierigkeiten zu gefährden, wurde die Obergrenze der Temperatur so gewählt, daß ein Keimwachstum noch möglich war. Die Keime wuchsen in allen Fällen logarithmisch. Die Geschwindigkeitskonstanten waren temperaturabhängig mit einem Maximalwert bei 40°C (vgl. Abschnitt 4.1.).

Die Konzentration der Konservierungsmittel wurde so gewählt, daß unter den gegebenen Bedingungen kinetische Experimente durchgeführt werden konnten. Die Halbwertszeiten der Abtötung lagen zwischen 10 und 30 Minuten.

3.5. Versuche zur Wachstums- und Absterbekinetik von S.aureus

3.5.1. Versuchsablauf

Am Vorabend des Experimentes wurde eine Kolonie der letzten Agar-Kultur mit einer ausgeglühten Impföse in 4.5 ml N1-Bouillon überführt und die Keimsuspension 12 - 15 Stunden bei 37.5°C in Inkubator belassen.
Am Versuchstag wurden 0.5 ml der Muttersuspension mit 49.5 ml frischer N1-Bouillon von 37.5°C verdünnt. Anschließend wuchs die Kultur innerhalb von 90 Minuten im Schüttelwasserbad auf etwa $1x10^7$ Keime / ml an. Die Kontrolle erfolgte photometrisch.
Nach Erreichen der gewünschten Keimzahl wurden 0.5 ml der Suspension in 50.5 ml frische, auf Versuchstemperatur erwärmte N1-Bouillon überimpft. Das Ausgangsvolumen betrug damit 51.0 ml.
Nach einer Wachstumsphase von 90 Minuten, in der sich die Keime gegebenenfalls an die veränderte Temperatur gewöhnen konnten, wurde das Konservierungsmittel zugegeben.

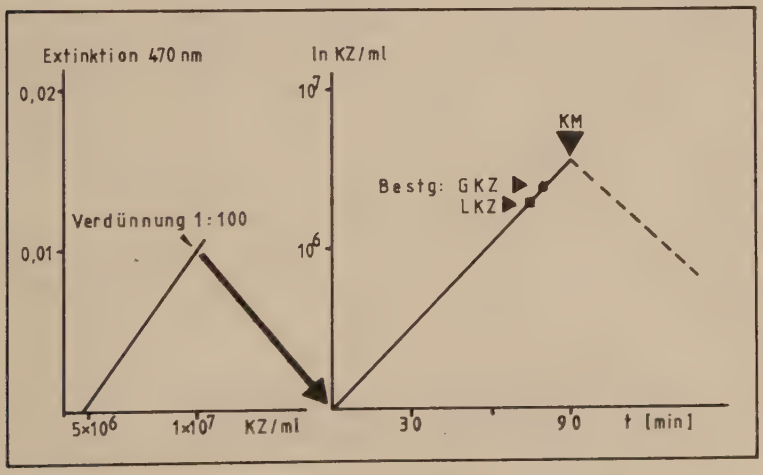


Abb.3-7 Anzucht der Keime

Zur nachträglichen Kontrolle des Wachstums wurden nach 75 und 80 Minuten zwei Proben gezogen und nach der Plattenmethode bzw. mit dem Coulter Counter ausgewertet. Aus diesen Meßwerten konnte die Lebendkeimzahl zum Zeitpunkt der Zugabe des Konservierungsmittels extrapoliert werden.

Im Anschluß an die Wachstumsphase wurden 0.5 ml der temperierten Konservierungsmittelstammlösung der Keimsuspension zugesetzt. Damit betrug das Volumen 50.0 ml.

Der Kultur wurden nach 1, 10, 20, 30 und 40 Minuten 0.5 ml Keimsuspension entnommen und in 49.5 ml auf Versuchstemperatur erwärmte Nortons Bouillon überimpft.

Nach intensivem Mischen wurden aus der neuen Kultur 0.5 ml entnommen und die Lebendkeimzahl nach der Plattenmethode bestimmt.

Zur Untersuchung der Anfangsphase der Regeneration nach der Plattenmethode wurden sofort Proben in Intervallen von 10 Minuten gezogen.

Zur Vermessung der Gesamtkeimzahl im Coulter Counter mußte die Kultur mindestens 1×10^5 Keime / ml aufweisen. Nach einer Wachstumsphase von 60 - 180 Minuten wurde dann die Zunahme der Gesamt-

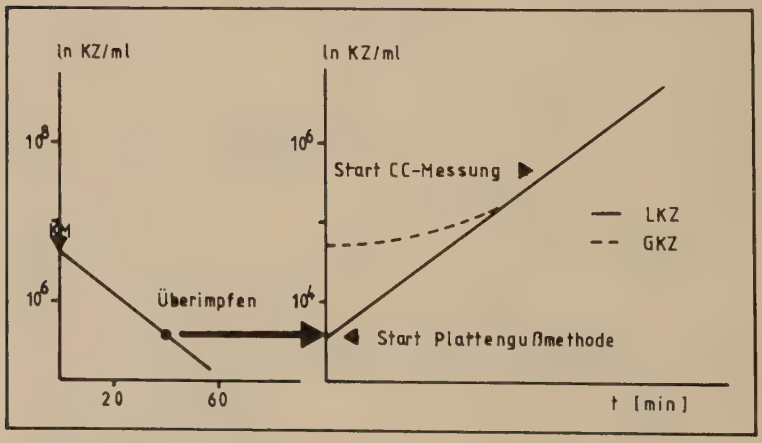


Abb.3-8 Absterben und Regeneration von S.aureus unter Konservierungsmitteleinfluß
(Beispiel : Probe nach 40 Minuten Exposition)

keimzahl in Abständen von 10 Minuten vermessen.
Es war vorgesehen, den Effekt von je drei Konzentrationen zweier Konservierungsmittel bei drei Temperaturen zu untersuchen. Das ist auch aus dem Versuchsplan für BAC ersichtlich (s.Tabelle 3-3 a).
Die Plattenmethode sollte neben der Coulter Counter Technik zur Absicherung der Daten eingesetzt werden.
Es zeigte sich aber, daß die Ausgangskeimzahlen der beiden Methoden deutlich voneinander abwichen. Daher wurde die Anfangsphase der Regeneration in einigen Versuchen nach der Plattenmethode intensiver untersucht.
Für CHG wurde der Versuchsplan auf vier Temperaturen und vier Konzentrationen erweitert (s.Tabelle 3-3 b). Für BAC wurde er bei 37.5°C auf fünf Konzentrationen ausgedehnt.
Waren lange Generationszeiten über 30 Minuten oder besonders kurze Halbwertszeiten unter 8 Minuten abzusehen, so wurde nur die Plattenmethode zur Keimzahlbestimmung eingesetzt.
Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten von S.aureus wurden auch ohne Zugabe von Konservierungsmittel bei den gewählten Temperaturen bestimmt (s. Tabelle 3-2).
Ein Teil der Experimente wurde wiederholt, um die Reproduzierbarkeit nachzuweisen.

Tab.3-2 Versuchsplan zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf Wachstum und Absterben von S.aureus in N1-Bouillon ohne Zusatz von Konservierungsmittel

	Temp [°C]							
Methode	25.0	30.0	35.0	37.5	40.0	43.0	46.0	50.0
CC-Technik			1	2	3			
Platte	4	5	6	7	8	9	10	11

Tab.3-3 Experimente zur Untersuchung des Absterbens und der Regeneration von S.aureus unter Konservierungsmitteleinfluß

a : Benzalkoniumchlorid

Temp [°C]	Konz [µg / ml] 0.600	0.700	0.800	0.900
35.0		1 a	2 a	3 a/c
37.5	4 b /c	5 a/b/c	6 a/b/c	7 a/c
40.0		8 a	9 a	10 a/c

b : Chlorhexidingluconat

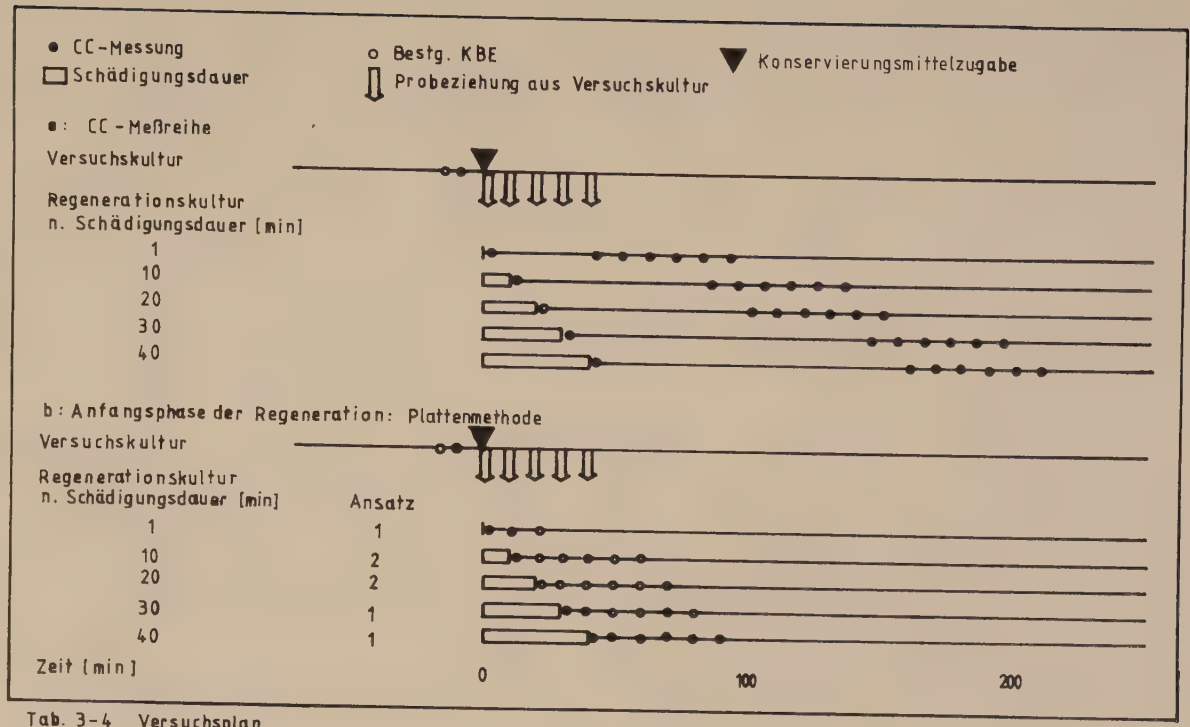
Temp [°C]	Konz [µg / ml] 0.500	0.625	0.750	0.875	1.000	1.125	1.500	2.000
35.0		1a	2a	3a	4a/c			
37.5	5a	6a	7a	8a	9a/c		10b	11b
40.0		12b	13a	14a/b	15a	16a/c		
43.0		17b	18b	19b	20b			

a : Absterben und Regeneration nach der Coulter Counter- und Plattenmethode
b : Absterben nach der Plattenmethode
c : Regeneration nach der Plattenmethode

3.5.2. Versuchsplan und Erläuterungen zur Auswertung

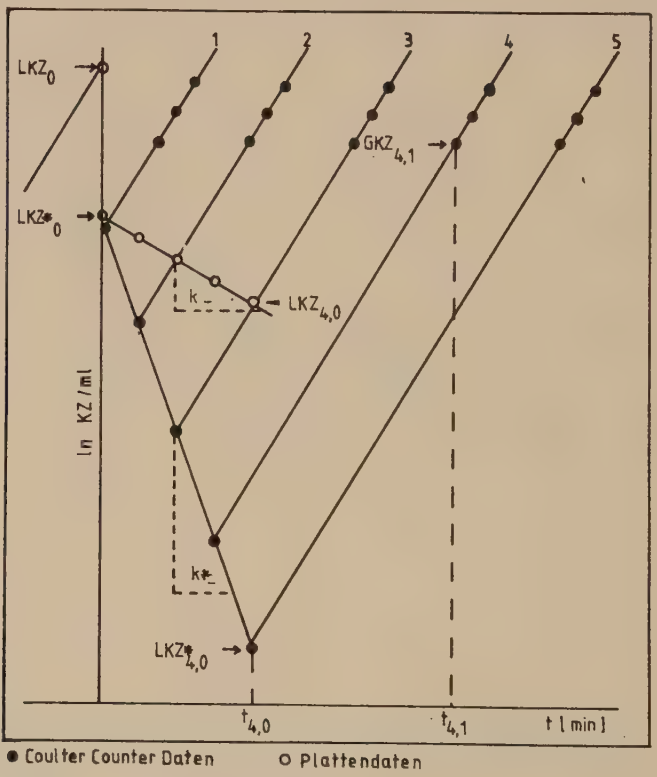
Im Verlauf jedes Experimentes wurden stets die Keimzahlen mehrerer Suspensionen nebeneinander bestimmt. Aus der Versuchskultur, der Konservierungsmittel zugefügt wurde, wurden fünf Proben gezogen und in Inaktivierungsbouillon überimpft. In diesen Regenerationskulturen wurden Lebendkeimzahl und Gesamtkeimzahl in regelmäßigen Intervallen überprüft.

Die zeitliche Wachstumsverzögerung in der Anfangsphase der Regeneration ließ in den Coulter Counter Experimenten eine kontinuier-



Tab. 3-4 Versuchsplan

liche Probenziehung zu, so daß alle Informationen aus einem Versuchsansatz gewonnen werden konnten (s.Tabelle 3-4a).
Die Untersuchung der Anfangsphase der Regeneration mußte sofort nach dem Überimpfen beginnen, daher waren für diese Experimente zwei Versuchsansätze notwendig (s.Tabelle 3-4a).
Wegen der großen Zahl anfallender Proben aus nebeneinanderlaufenden Versuchsreihen wurde eine aufwendige Symbolik erforderlich (s. Abb. 3-9).



● Coulter Counter Daten ○ Plattendaten

Abb. 3-9 Datenkennzeichnung eines Coulter Counter Versuches

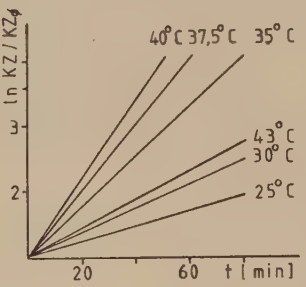
Die Lebendkeimzahl unmittelbar vor Zugabe des Konservierungsmittels zur Zeit t_0 wurde mit LKZ_0 bezeichnet.
Der absterbenden Kultur wurde zu den Zeiten $t_{i,0}$ Keimsuspension mit $LKZ_{i,0}$ lebensfähigen Keimen entnommen und in Inaktivierungsbouillon überimpft. Aus der i-ten Regenerationskultur wurde zu den Zeiten $t_{i,j}$ Proben zur Keimzahlbestimmung gezogen. Die Gesamtkeimzahl $GKZ_{i,j}$ wurde mit dem Coulter Counter, die Lebendkeimzahl $LKZ_{i,j}$ nach der Plattenmethode ermittelt, die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten k_i aus der Veränderung der Keimzahl nach der Zeit berechnet. Der Anteil der toten Keime an der Gesamtkeimzahl lag in der logarithmischen Wachstumsphase zum Zeitpunkt der CC-Messung meist unter 1% und erreichte nur in extremen Fällen 5% . Er konnte deshalb vernachlässigt werden. Die rechnerische Extrapolation der CC-Meßdaten ergab damit den Schätzwert $LKZ^*_{i,0}$ für die Lebendkeimzahl zum Zeitpunkt $t_{i,0}$.
Die Absterbegeschwindigkeitskonstante k_- nach der Plattenmethode wurde aus der Veränderung der Lebendkeimzahlen $LKZ_{i,0}$ nach der Zeit berechnet. Die entsprechende Größe k^*_- aus den CC-Daten erwies sich als experimenteller Artefakt.
Die rechnerische Extrapolation der Plattendaten $LKZ_{i,0}$ führte zu dem Schätzwert der Lebendkeimzahl LKZ^*_0 unmittelbar nach Zugabe des Konservierungsmittels.

3.6. Ergebnisse

3.6.1. Temperatureinfluß auf Wachstum und Absterben von S.aureus

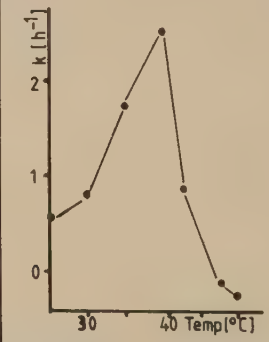
Im Bereich von 25 bis 50°C wurde untersucht, wie sich das Wachstumsverhalten von S.aureus in Abwesenheit von Konservierungsmitteln veränderte.
Bei allen untersuchten Temperaturen entsprach die Veränderung der Keimzahl einem Vorgang erster Ordnung (s.Abb. 3-10).

Abb. 3-10
Wachstum von S. aureus in Abhängigkeit von der Temperatur



Die Geschwindigkeitskonstanten nehmen von 25 auf 30°C langsam und von 30 auf 40°C schnell zu, erreichen ein ausgeprägtes Maximum bei 40°C und werden bei weiterer Temperaturerhöhung auf 43°C rasch kleiner. Oberhalb von 43°C sterben die Keime ab, das heißt, die Geschwindigkeitskonstante wird negativ (s.Abb. 3-11, Tab. 3-5).

Abb. 3-11
Veränderung der Wachstums- und Absterbegeschwindigkeitskonstanten von S.aureus in Abhängigkeit von der Temperatur



Tab.3-5 Wachstum und Absterben von S.aureus in N1-Bouillon in Abhängigkeit von der Temperatur

Methode	Temp [°C]	Wachstumsgeschw.konstante [h^{-1}]	Generationszeit [min]
PL	25.0	0.56	74
PL	30.0	0.79	53
PL	35.0	1.74	24
PL		1.72	25
CC		1.84	22
CC		1.72	25
PL	37.5	2.08	20
PL		2.09	20
CC		2.18	18
CC		2.12	19
PL	40.0	2.52	16
PL		2.54	16
CC		2.45	17
CC		2.47	17
PL	43.0	0.87	48
PL		0.81	51
PL	46.0	- 0.11	
PL	50.0	- 0.24	

3.6.2. Absterben und Regeneration von S.aureus unter Konservierungsmitteleinfluß

3.6.2.1. Benzalkoniumchlorid

Der Einfluß von 0.7, 0.8 und 0.9 µg/ml BAC auf S.aureus wurde bei 35.0, 37.5 und 40°C untersucht. In der Regel wurden die Lebendkeimzahlen am Ende der Schädigung nach der Coulter Counter- und Plattenmethode nebeneinander bestimmt. Durch zusätzliche Versuche auf dem mittleren Temperaturniveau wurden Reproduzierbarkeit und Veränderung der Absterbegeschwindigkeitskonstante (AGK) bei Senkung der Konservierungsmittelkonzentration auf 0.6 µg/ml BAC untersucht.

Die erste Versuchsreihe wurde bei 35°C mit 0.7, 0.8 und 0.9 µg/ml BAC durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-6 zusammengefaßt.

Tab.3-6 Absterbekinetik von S.aureus in N1-Bouillon bei 35°C unter Einwirkung von BAC

Dauer der Expos. [min]	Benzalkoniumchlorid-Konzentration 0.7 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.8 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.9 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	3.9×10^4*			2.7×10^4*			5.0×10^4*		
0*	3.9×10^4**			2.7×10^4**			2.7×10^4**		
1	3.9×10^4	3.9×10^4	1.96	2.5×10^4	2.7×10^4	1.88	2.5×10^4	2.4×10^4	1.85
10	3.0×10^4	9.2×10^3	1.92	1.6×10^4	6.2×10^3	1.82	1.3×10^4	5.6×10^3	1.90
20	2.3×10^4	6.6×10^3	1.89	9.3×10^3	3.3×10^3	1.81	6.0×10^3	2.1×10^3	1.86
30	1.8×10^4	5.7×10^3	1.81	5.7×10^3	8.7×10^2	1.78	2.9×10^3	3.3×10^2	1.81
40	1.4×10^4	3.1×10^3	1.83	3.3×10^3	2.7×10^2	1.81	1.3×10^3	1.1×10^2	1.90

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert (Plattenmethode)
*** aus Wachstumsgeschwindigkeit nach Regeneration rückextrapoliert (CC)

Mittelwert der Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten : 1.855 h^{-1}
Standardabweichung des Mittelwertes 0.051 h

Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten der regenerierten Kulturen sind innerhalb enger Grenzen reproduzierbar (Mittelwert : $1.86 h^{-1}$, Standardabweichung : 0.05 h).

Die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) lag bei einer Exposition von mindestens 10 Minuten immer deutlich höher als die entsprechende Zahl überlebender Keime, die durch Rückextrapolation der Coulter Counter-Daten aus der Wiederanzuchtphase gefunden wurde. Die Differenzen nahmen mit längerer Schädigungsdauer und ansteigender BAC-Konzentration zu. Zwei Ursachen können für die Unterschiede verantwortlich sein :

- Die Keime finden auf der Agar Platte günstigere Bedingungen für ein Überleben vor. Das würde bedeuten, daß in der Schüttelkultur ein Teil der geschädigten Keime abstirbt, der auf dem Nährboden vermehrungsfähig bleibt und Kolonien bildet.
- Die Keime der Schüttelkultur wachsen erst mit einiger Verzögerung wieder logarithmisch an.

Diese Probleme wurden in zusätzlichen Experimenten untersucht. Der Einfluß des Nährmediums auf die Regeneration wurde durch Variation der Zusammensetzung der Regenerationsbouillon überprüft. Detaillierte Informationen über den Beginn der Wachstumsphase und eventuelle Verzögerungen wurden erhalten, indem die Veränderung der Lebendkeimzahl in kurzen Zeitintervallen nach der Plattenmethode bestimmt wurde.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe bei 35°C sind in Abbildung 3-12 an einem repräsentativen Beispiel graphisch dargestellt.

Werden die Lebendkeimzahlen, die unmittelbar nach dem Überimpfen nach der Plattenmethode bestimmt wurden, halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, so zeigt sich, daß bei niedrigen Konzentrationen die Punkte alle auf einer Geraden liegen. Deshalb kann man davon ausgehen, daß das Absterben nach erster Ordnung verläuft. Die durch Extrapolation der Anzuchtdaten ermittelten Lebendkeimzahlen vor Zugabe des Konservierungsmittels lagen bei hohen Konzentrationen deutlich über den Werten, die durch Extrapolation der Absterbekurve nach Zugabe des Konservierungsmittels erhalten wurden. Daraus kann man schließen, daß bei hohen Konzentrationen ein zweiphasiger

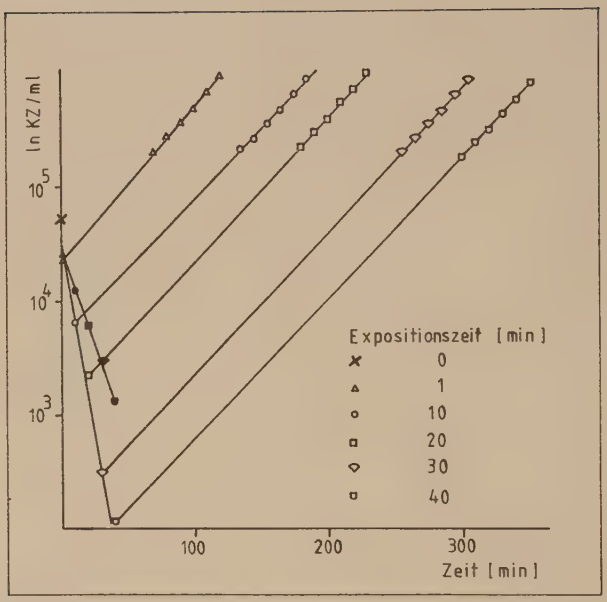


Abb.3-12 Absterben und Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 0.9 µg/ml BAC bei 35°C (Coulter Counter : offene Symbole, Platte : geschlossene Symbole)

Absterbevorgang vorliegt. Auf die rasche Initialphase mit überproportionaler Verminderung der Keimzahl folgt exponentielles Absterben, wie es bei niedrigen Konzentrationen ausschließlich beobachtet wurde.

Die Lebendkeimzahlen zum Zeitpunkt des Überimpfens, die durch Rückextrapolation aus den Coulter Counter Daten der Wiederanzucht berechnet wurden, lagen deutlich unter den entsprechenden Werten, die mit der Plattenmethode direkt bestimmt wurden. Sie waren aber weniger zuverlässig und die Extrapolation setzt voraus, daß das logarithmische Wachstum allenfalls mit einer Verzögerung beginnt, die vernachlässigt werden kann. Deshalb wurde die Anfangsphase der Regeneration nach der Plattenmethode untersucht.

Das logarithmische Wachstum setzte mit zeitlicher Verzögerung ein. Die Zeitspanne stieg mit zunehmender Schädigungsdauer an. Betrug

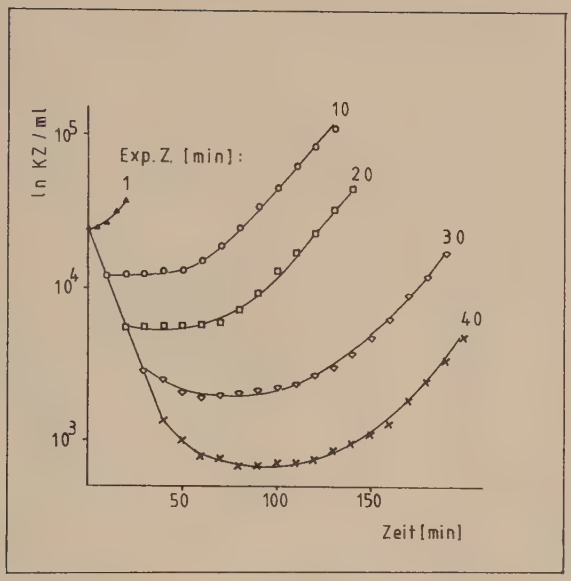


Abb.3-13 Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 0.9 µg/ml BAC bei 35°C

die Einwirkungszeit mindestens 30 Minuten, so starben in der Inaktivierungsbouillon Keime ab, die auf dem Nährboden noch Kolonien bilden konnten (s. Abb. 3-13).
In der zweiten Serie wurde Absterben und Regeneration mit 0,7, 0.8 und 0.9 µg/ml BAC bei 37.5°C nach der kombinierten Coulter Counter-/Plattenmethode untersucht. Qualitativ waren die Ergebnisse mit den entsprechenden der Versuchsreihe bei 35°C vergleichbar (s.Tab. 3-7). Repräsentativ für diese Experimente ist in Abb. 3-14 der Versuch mit 0.8 µg/ml BAC dargestellt.

Tab.3-7 Absterbekinetik von S.aureus in N1-Bouillon bei 37.5°C unter Einwirkung von BAC

Dauer der Expos. [min]	Benzalkoniumchlorid-Konzentration 0.7 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.8 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.9 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	$2.8 \times 10^{4*}$			$3.0 \times 10^{4*}$			$3.3 \times 10^{4*}$		
0*	$2.9 \times 10^{4**}$			$1.5 \times 10^{4**}$			$1.6 \times 10^{4**}$		
1	2.8×10^{4}	2.0×10^{4}	2.32	1.4×10^{4}	1.1×10^{4}	2.31	1.6×10^{4}	1.2×10^{4}	2.11
10	2.0×10^{4}	5.6×10^{3}	2.04	8.2×10^{3}	2.6×10^{3}	2.15	7.0×10^{3}	1.2×10^{3}	2.05
20	1.4×10^{4}	2.4×10^{3}	2.13	4.4×10^{3}	1.1×10^{3}	2.03	3.0×10^{3}	3.4×10^{2}	2.19
30	9.9×10^{3}	9.9×10^{2}	2.23	2.5×10^{3}	1.3×10^{2}	2.02	1.2×10^{2}	3.3×10^{1}	2.08
40	7.0×10^{3}	4.5×10^{2}	2.21	1.3×10^{3}	2.1×10^{1}	2.24	6.0×10^{2}	5.6×10^{0}	2.21

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert (Plattenmethode)
*** aus Wachstumsgeschwindigkeit nach Regeneration rückextrapoliert (CC)

Mittelwert der Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten : 2.150 h^{-1}
Standardabweichung des Mittelwertes 0.099 h

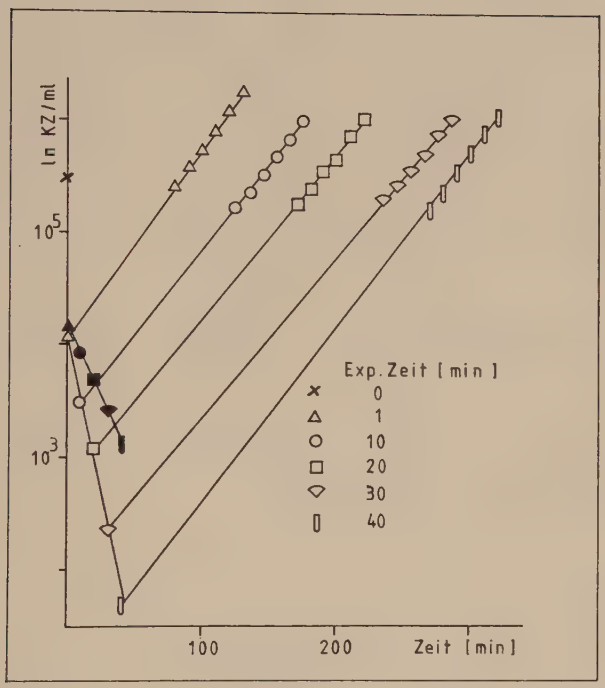


Abb.3-14 Absterben und Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 0.8 µg/ml BAC bei 37.5°C (Coulter Counter : geschlossene Symbole, Platte : offene Symbole)

Die Reproduzierbarkeit der Plattendaten wurde in zwei Wiederholungsversuchen überprüft (s.Tabelle 3-8). Das Konzentrationsintervall der Plattenversuche wurde gleichzeitig um eine Stufe erweitert (0.6 µg/ml). Die Graphik 3-15 läßt erkennen, daß die Reproduzierbarkeit gut ist.

Tab.3-8 Absterbekinetik von S.aureus unter Einwirkung von BAC bei 37.5°C

	Konz µg/ml		
	0.600	0.700	0.800
Dauer der Schädigung [min]	Überlebende Keime/ml	Überlebende Keime/ml	Überlebende Keime/ml
0	$1.9 \times 10^{4*}$	$2.5 \times 10^{4*}$	$2.5 \times 10^{4*}$
0*	$1.8 \times 10^{4**}$	$2.4 \times 10^{4**}$	$1.9 \times 10^{4**}$
1	1.8×10^{4}	2.3×10^{4}	1.8×10^{4}
10	1.6×10^{4}	1.7×10^{4}	1.0×10^{4}
20	1.5×10^{4}	1.2×10^{4}	5.8×10^{3}
30	1.3×10^{4}	8.4×10^{4}	3.3×10^{3}
40	1.2×10^{4}	5.9×10^{4}	1.8×10^{3}

* aus Anzuchtphase vorausextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert

Abb. 3-15
Reproduzierbarkeit der Absterbekinetik von S. aureus bei 37,5°C nach der Plattenmethode

▲ 0,7 µg/ml BAC (1)
▼ 0,7 µg/ml BAC (2)
▫ 0,8 µg/ml BAC (1)
▪ 0,8 µg/ml BAC (2)

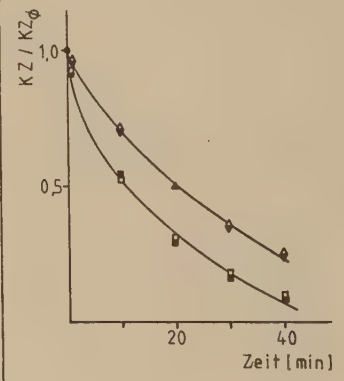
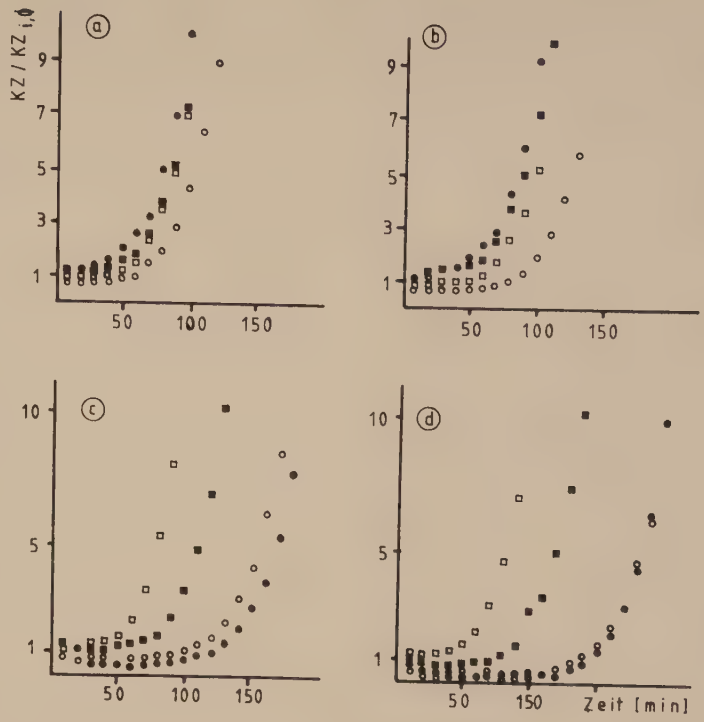


Abb. 3-16
Regeneration von S. aureus nach Behandlung mit BAC bei 37,5°C

Exp. Zeit [min] : a : 10
b : 20
c : 30
d : 40

Konz [µg/ml] : ▫ : 0,6
▪ : 0,7
● : 0,8
○ : 0,9



Die Veränderung der Anfangsphase der Regeneration in Abhängigkeit von der Konservierungsmittelkonzentration wurde nach der Plattenmethode bestimmt. Die Experimente erstreckten sich auf das Konzentrationsintervall zwischen 0.6 und 0.9 µg/ml BAC. Zur Darstellung der Unterschiede wurden die Regenerationskurven gleicher Expositionszeiten in je einer Graphik zusammengefaßt (s.Abb.3-16). Bei kurzer Expositionszeit ist der Verlauf der Regeneration nahezu unabhängig von der Konservierungsmittelkonzentration. Bei längerer Einwirkungszeit werden Unterschiede zwischen hohen und niedrigen Konzentrationsbereichen deutlicher. Der Effekt der beiden höchsten Konzentrationen, 0.8 und 0.9 µg/ml, ist bei langer Expositionszeit praktisch gleich.

Die Reproduzierbarkeit der Anfangsphase der Regeneration wurde in

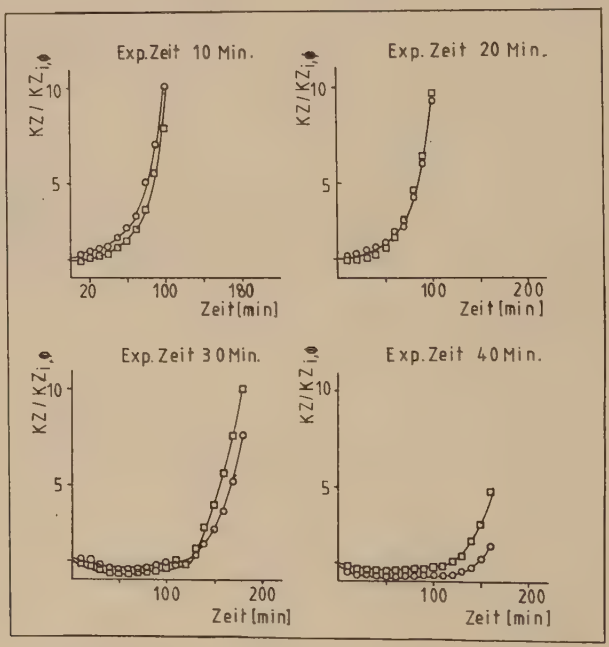


Abb. 3-17 Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 0.8 µg/ml BAC bei 37.5°C

einem Wiederholungsversuch überprüft. Die Übereinstimmung der Kurven ist für Expositionszeiten zwischen 10 und 30 Minuten gut, für 40 Minuten befriedigend (s.Abb. 3-17).
Nachdem feststand, daß die Keime in der Regenerationsphase verzögert anwachsen, wurde zusätzlich der Einfluß der Kulturbedingungen auf das Überleben von S.aureus überprüft.
Die vergleichende Auswertung der Coulter Counter- und Plattenexperimente ergab Hinweise darauf, daß die Überlebensbedingungen der Keime auf dem Nähragar besser sein könnten als in der Suspensionskultur. Auf den Platten wuchsen deutlich mehr Keime als in der Inaktivierungsbouillon. Dafür wurden folgende Ursachen in Betracht gezogen :

- Die Inaktivierungsstoffe, Thioglykolat bzw. Tween 80 und Lecithin, beeinträchtigen das Wachstum, unter Umständen aber erst nach längerer Einwirkungsdauer.
- Der Medienwechsel in einer empfindlichen Phase verringert die Überlebensrate.

Um diese Möglichkeiten zu prüfen, wurden die Keime mit 0.8 µg/ml BAC behandelt und die Regeneration untersucht.
In Nortons Bouillon ohne Thioglykolat wuchsen die Keime nach 30 und 40 Minuten Expositionszeit schlechter an (s.Abb. 3-18) als mit Thioglykolat.

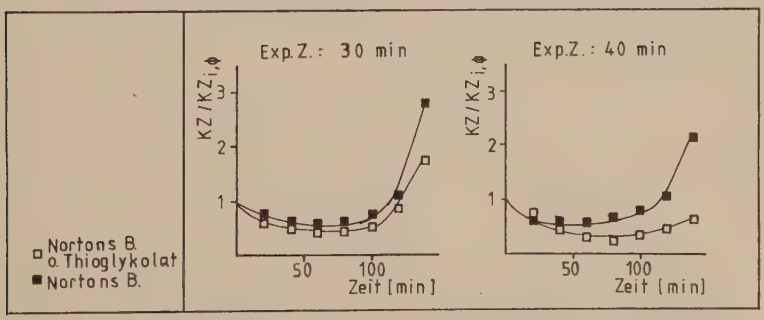


Abb. 3-18 Regeneration von S.aureus in Nortons Bouillon ohne Thioglykolat nach Schädigung mit 0.8 µg/ml BAC bei 37.5°C

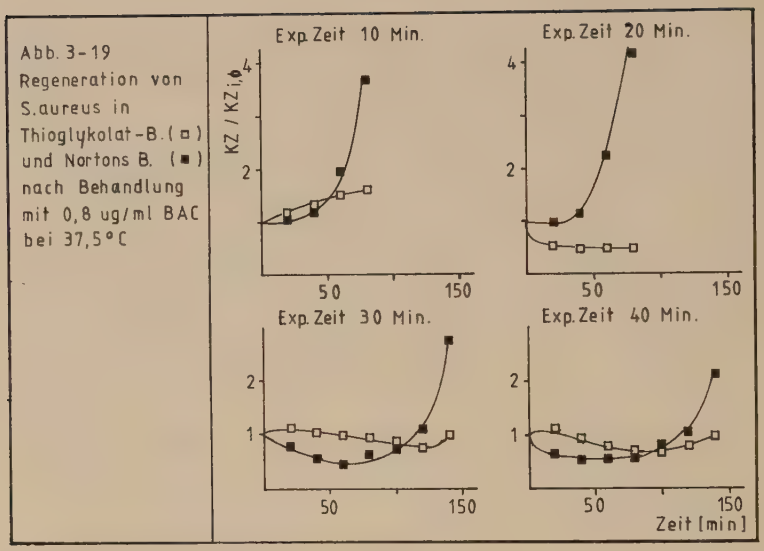


Abb. 3-19
Regeneration von S.aureus in Thioglykolat-B. (□) und Nortons B. (■) nach Behandlung mit 0,8 ug/ml BAC bei 37,5°C

Thioglykolat Bouillon, Merck, die statt Tween 80 und Lecithin Hefe enthält, bringt für geschädigte Staphylococcen sichtbar schlechtere Überlebenschancen nach einer Exposition zwischen 10 und 40 Minuten (s.Abb. 3-19).

Eine kurzfristige Inaktivierung der Konservierungsmittel in Nortons Bouillon mit anschließender Regeneration der Keime in N1-Medium brachte keine Vorteile für die Wiederanzucht (s.Abb. 3-20) gegenüber Nortons Inaktivierungsbouillon.

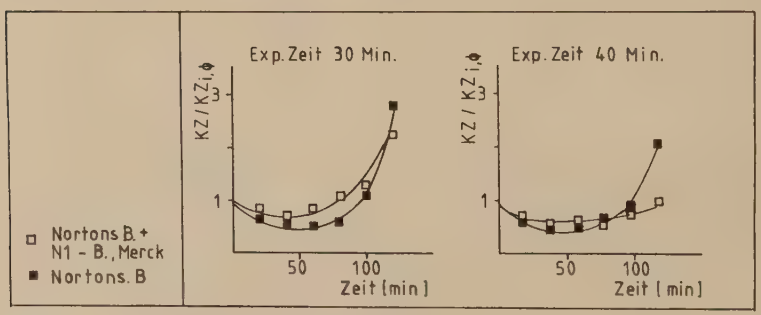


Abb. 3-20 Regeneration von S.aureus in N1-Bouillon nach Inaktivierung von 0.8 µg/ml BAC in Nortons Bouillon

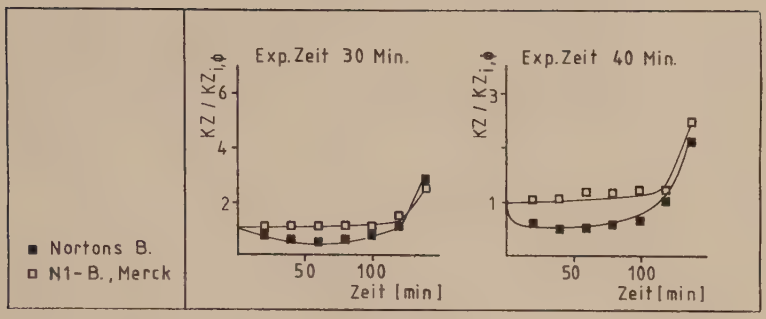


Abb. 3-21 Regeneration von S.aureus in N1-Bouillon nach Schädigung mit 0.8 µg/ml BAC bei 37.5°C

Die Wiederanzucht der Keime in N1-Bouillon ohne vorherige Inaktivierung verhinderte ein Absterben der Keime zu Beginn, verkürzte aber die Regenerationszeit der Überlebenden nicht, wie Abbildung 3-21 zeigt. Vergleicht man aber die Absterbegeschwindigkeitskonstante dieses Versuches mit der entsprechenden des Experimentes in Nortons Bouillon, so liegt die Absterberate sichtlich höher, wenn das Konservierungsmittel nur durch Verdünnung inaktiviert wurde (s.Abb. 3-22). Daraus könnte man schließen, daß stärker geschädigte Keime beim Überimpfen in N1-Bouillon innerhalb der ersten 60 Sekunden absterben und deshalb in dem beschriebenen Versuch nicht mehr erfaßt werden.

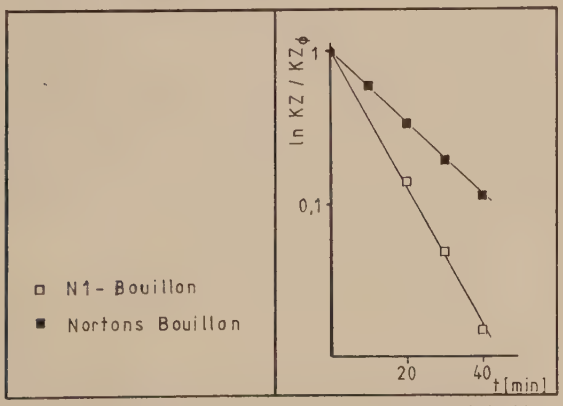


Abb. 3-22 Absterbekinetik von S.aureus in Abhängigkeit von der Regenerationsbouillon

Tab.3-9 Absterbekinetik von S.aureus in N1-Bouillon bei 40°C unter Einwirkung von BAC

Dauer der Expos. [min]	Benzalkoniumchlorid-Konzentration 0.7 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.8 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.9 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	$3.8x10^{4*}$			$3.2x10^{4*}$			$7.9x10^{4*}$		
0*	$3.8x10^{4**}$			$1.7x10^{4**}$			$4.4x10^{4**}$		
1	$3.6x10^{4}$	$3.6x10^{4}$	2.49	$1.6x10^{4}$	$1.3x10^{4}$	2.44	$4.0x10^{4}$	$3.1x10^{4}$	2.45
10	$2.6x10^{4}$	$6.5x10^{3}$	2.33	$9.5x10^{3}$	$2.6x10^{3}$	2.42	$2.0x10^{4}$	$4.1x10^{3}$	2.38
20	$1.7x10^{4}$	$3.1x10^{3}$	2.24	$5.2x10^{3}$	$1.1x10^{3}$	2.40	$9.0x10^{3}$	$1.2x10^{3}$	2.44
30	$1.1x10^{4}$	$2.0x10^{3}$	2.28	$2.9x10^{3}$	$1.4x10^{2}$	2.47	$3.9x10^{3}$	$1.8x10^{2}$	2.52
40	$7.6x10^{3}$	$9.4x10^{2}$	2.30	$1.6x10^{3}$	$4.1x10^{1}$	2.51	$1.8x10^{3}$	$6.7x10^{1}$	2.52

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert (Plattenmethode)
*** aus Wachstumsgeschwindigkeit nach Regeneration rückextrapoliert (CC)

Mittelwert der Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten : 2.413 h^{-1}
Standardabweichung des Mittelwertes 0.090 h

Die höchste Temperatur, bei der die Wirkung von BAC untersucht wurde, war 40°C. Ohne weitere Zusatzversuche wurde die Versuchsanordnung der Meßreihe bei 35°C übernommen. Kombinierte Coulter Counter- und Plattenversuche wurden mit 0.7, 0.8 und 0.9 µg/ml BAC angesetzt.

Die Ergebnisse dieser Serie sind qualitativ mit den entsprechenden Versuchen bei den niedrigeren Temperaturen vergleichbar (s. Tabelle 3-9).

Die Anfangsphase der Regeneration wurde nach Einwirkung von 0.9 µg/ml BAC untersucht (s.Abb. 3-23). Der Verlauf der Regenerationsphase entsprach fast vollkommen dem Ergebnis, das bei 37.5°C beobachtet wurde.

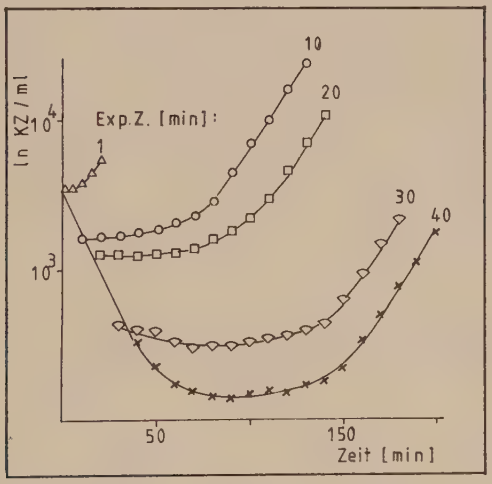


Abb. 3-23 Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 0.8 µg/ml BAC bei 40°C

Abhängigkeit der Absterbegeschwindigkeitskonstanten von den Versuchsvariablen

Aus den Lebendkeimzahlen, die unmittelbar nach dem Überimpfen in die Inaktivierungsbouillon nach der Plattenmethode bestimmt wurden, kann der Verlauf der direkten Abtötung verfolgt werden. Nach Beendigung der raschen Initialphase handelt es sich entsprechend der gängigen Lehrmeinung um einen exponentiellen Vorgang, der in allen Fällen durch eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung beschrieben wird. Die Abhängigkeit der Absterbegeschwindigkeitskonstanten von den Versuchsvariablen Konzentration und Temperatur ist in Abb. 3-24 und Tab. 3-10 dargestellt.

Die Absterbegeschwindigkeitskonstante steigt mit zunehmender Konzentration monoton an. Bei Erhöhung der Temperatur von 35 auf 37.5°C wächst sie bei allen Konzentrationsstufen. Wird die Temperatur weiter gesteigert, ist die Tendenz nicht mehr so eindeutig. Die Geschwindigkeitskonstante nimmt bei niedrigerer Konzentration mit der Temperatur zu. Auf dem mittleren Konzentrationsniveau sind sie bei 37.5 und 40°C gleich, auf dem oberen wird die Absterbegeschwindigkeitskonstante sogar kleiner, wenn die Temperatur von 37.5 auf 40°C steigt.

Tab. 3-10 Absterbegeschwindigkeitskonstanten [h^{-1}] von S.aureus in N1-Bouillon in Abhängigkeit von BAC-Konzentration und Temperatur

Temp [°C]	Konz [µg/ml] 0.600	0.700	0.800	0.900
35.0		-1.59	-3.10	-4.51
37.5	-0.70	-2.14	-3.64	-5.08
37.5		-2.12	-3.51	
40.0		-2.45	-3.56	-4.81

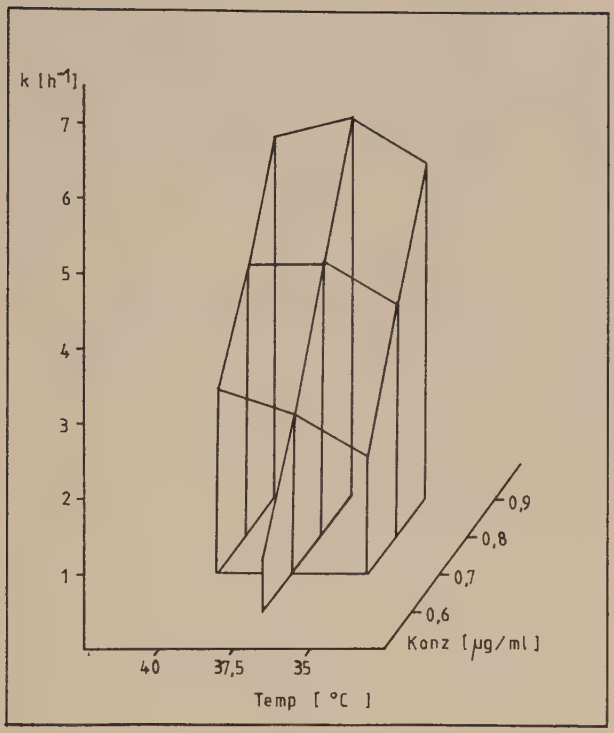


Abb. 3-24 Absterbegeschwindigkeitskonstanten von S.aureus in N1-Bouillon in Abhängigkeit von BAC-Konzentration und Temperatur

3.6.2.2. Chlorhexidingluconat

Ein etwas umfangreicherer, ähnlich angelegter Versuchsplan wurde mit CHG durchgeführt. Das Temperaturintervall wurde um eine Messreihe bei 43°C erweitert, bei der aber nur die Abtötung und nicht die Regeneration untersucht wurde. Die Konzentrationen der Konservierungsmittel wurde auf vier Niveaus mit 0.625, 0.750, 0.875 und 1.000 µg/ml CHG variiert.

Die Abweichungen zwischen Coulter Counter- und Plattenergebnissen wurden wieder beobachtet. Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten, die nach der Regeneration mit der Coulter Counter Technik gefunden wurden, stimmten gut überein (bei 35°C : $k = 1.85\ h^{-1}$, Standardabweichung = 0.049 h).

Für die niedrigste Temperatur (35°C) sind in Tab. 3-11 die Ergebnisse zusammengefaßt und in Abb. 3-25 der Versuch mit der höchsten Konzentration wiedergegeben.

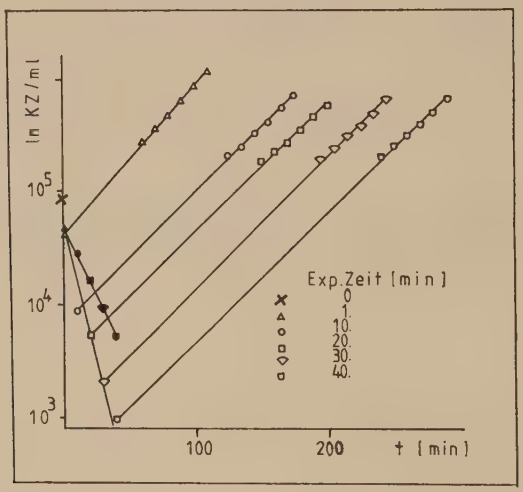


Abb. 3-25 Absterben und Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 1.0 µg/ml CHG bei 35°C (Coulter Counter : offene Symbole, Platte : geschlossene Symbole)

Tab.3-11 Absterbekinetik von S.aureus in N1-Bouillon bei 35°C unter Einwirkung von CHG

Dauer der Expos. [min]	Chlorhexidingluconat-Konzentration 0.625 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.750 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	$3.5x10^4$*			$3.4x10^4$*		
0*	$3.5x10^4$**			$3.4x10^4$**		
1	$3.4x10^4$	$3.4x10^4$	1.91	$3.3x10^4$	$2.6x10^4$	1.92
10	$2.9x10^4$	$7.8x10^3$	1.86	$2.6x10^4$	$5.6x10^4$	1.86
20	$2.5x10^4$	$7.0x10^3$	1.83	$1.9x10^4$	$4.8x10^3$	1.81
30	$2.1x10^4$	$4.5x10^3$	1.88	$1.4x10^4$	$2.3x10^3$	1.85
40	$1.8x10^4$	$3.9x10^3$	1.87	$1.0x10^4$	$2.0x10^3$	1.76

Dauer der Expos. [min]	Chlorhexidingluconat-Konzentration 0.875 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	1.000 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	$1.3x10^4$*			$9.3x10^4$*		
0*	$1.3x10^4$**			$4.9x10^4$**		
1	$1.3x10^4$	$8.7x10^3$	1.92	$4.6x10^4$	$4.4x10^4$	1.76
10	$8.8x10^3$	$1.3x10^3$	1.90	$8.4x10^4$	$1.7x10^4$	1.81
20	$5.9x10^3$	$8.7x10^2$	1.85	$1.6x10^4$	$5.8x10^3$	1.90
30	$4.0x10^3$	$3.8x10^2$	1.84	$9.3x10^3$	$2.0x10^3$	1.82
40	$2.7x10^3$	$2.4x10^2$	1.82	$5.3x10^3$	$6.9x10^2$	1.78

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert (Plattenmethode)
*** aus Wachstumsgeschw.keit nach Regen. rückextrapoliert (CC)

Mittelwert der Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten : 1.850 h^{-1}
Standardabweichung des Mittelwertes 0.049 h

Der Beginn des logarithmischen Wachstums ist auch bei CHG verzögert. Um einen quantitativen Vergleich mit den Ergebnissen für BAC zu ermöglichen, wurde in jeder Versuchsreihe bei der höchsten CHG-Konzentration der Beginn der Regeneration nach der Plattenmethode untersucht. Im Gegensatz zu den Befunden von BAC verringerte sich aber die Keimzahl zu Beginn der Regeneration nicht, sondern blieb weitgehend konstant (Abb. 3-26), bevor das exponentielle Wachstum einsetzte. Die Dauer der Wachstumsverzögerung nahm mit ansteigender Expositionszeit zu.

Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten der Regenerationsversuche nach der Plattenmethode wiesen mit $\bar{k} = 1.81\ h^{-1}$ einen geringfügig niedrigeren Mittelwert auf, als entsprechende Geschwindigkeitskonstanten, die mit dem Coulter Counter in einer späteren Phase gemessen wurden.

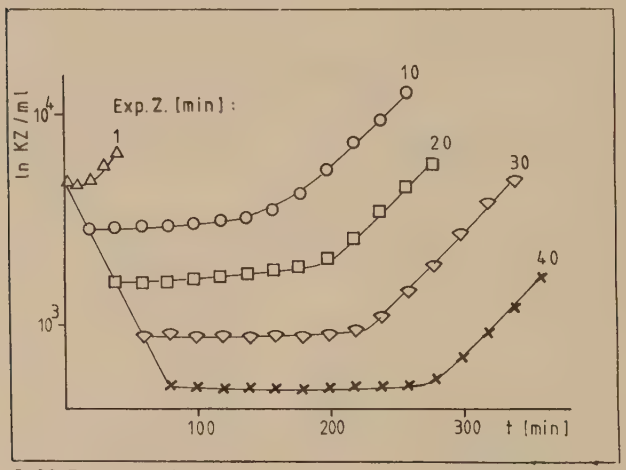


Abb. 3-26 Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 1.0 µg/ml CHG bei 35°C

Die eingesetzten CHG-Konzentrationen wurden bei 37.5°C um einen niedrigeren Wert von 0.5 µg/ml erweitert (Tab. 3-12). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Coulter Counter Daten wurde der Versuch mit 1.0 µg/ml CHG zweimal angesetzt (s.Abb. 3-27). Obwohl die Ergebnisse der Coulter Counter Versuche sehr empfindlich auf Schwankungen der Wachstumsverzögerung reagieren, war die Reproduzierbarkeit zufriedenstellend.

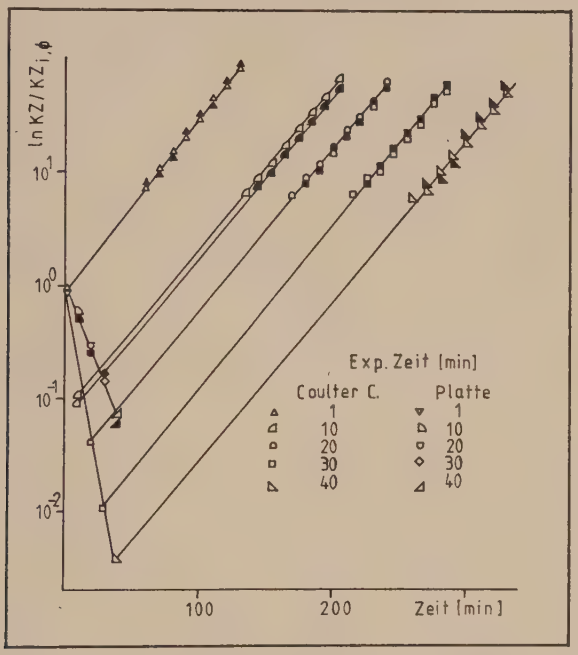


Abb. 3-27 Reproduzierbarkeit von Absterben und Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 1.0 µg/ml CHG bei 37.5°C (Versuch 1 : offene Symbole, Versuch 2 : geschlossene Symbole)

Tab.3-12 Absterbekinetik von S.aureus in N1-Bouillon bei 37.5°C unter Einwirkung von CHG

Dauer der Expos. [min]	Chlorhexidingluconat-Konzentration 0.500 µg/ml: Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.625 µg/ml: Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.750 µg/ml: Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	5.0×10^4*			2.6×10^4*			3.2×10^4*		
0*	5.2×10^4**			2.6×10^4**			3.3×10^4**		
1	5.1×10^4	5.3×10^4	2.17	2.6×10^4	1.8×10^4	2.20	3.1×10^4	2.1×10^4	2.18
10	4.3×10^4	8.9×10^3	2.20	1.9×10^4	3.5×10^3	2.12	2.1×10^4	2.6×10^3	2.13
20	3.9×10^4	7.8×10^3	2.15	1.5×10^4	2.6×10^3	2.11	1.4×10^4	1.5×10^3	2.11
30	3.2×10^4	6.3×10^3	2.12	1.1×10^4	1.3×10^3	2.15	9.0×10^3	5.5×10^2	2.14
40	2.7×10^4	5.2×10^3	2.15	8.2×10^3	8.1×10^2	2.13	5.5×10^3	3.8×10^2	2.06

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert (Plattenmethode)
*** aus Wachstumsgeschwindigkeit nach Regeneration rückextrapoliert (CC)

Fortsetzung Tab.3-12 Absterbekinetik von S.aureus in Nl-Bouillon bei 37.5°C unter Einwirkung CHG

Dauer der Expos. [min]	Chlorhexidingluconat-Konzentration 0.875 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	1.000 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	1.000 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	$4.3x10^{4}$*			$7.2x10^{4}$*			$4.1x10^{4}$*		
0*	$3.9x10^{4}$**			$3.9x10^{4}$**			$2.5x10^{4}$**		
1	$3.1x10^{4}$	$2.6x10^{4}$	2.15	$3.6x10^{4}$	$3.3x10^{4}$	2.08	$2.3x10^{4}$	$1.8x10^{4}$	2.18
10	$1.8x10^{4}$	$2.4x10^{3}$	2.09	$2.0x10^{4}$	$3.6x10^{3}$	1.98	$1.3x10^{4}$	$1.2x10^{3}$	2.16
20	$1.0x10^{4}$	$1.3x10^{3}$	2.05	$1.0x10^{4}$	$1.7x10^{3}$	2.03	$6.0x10^{3}$	$6.4x10^{2}$	2.09
30	$5.6x10^{4}$	$4.4x10^{3}$	2.06	$5.2x10^{4}$	$5.8x10^{3}$	2.12	$3.7x10^{3}$	$2.6x10^{2}$	2.02
40	$3.1x10^{3}$	$1.7x10^{2}$	2.03	$2.7x10^{3}$	$2.0x10^{2}$	2.08	$1.5x10^{3}$	$9.0x10^{1}$	1.99
40	$1.4x10^{4}$	$3.1x10^{3}$	1.83	$3.3x10^{3}$	$2.7x10^{2}$	1.81	$1.3x10^{3}$	$1.1x10^{2}$	1.90

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert (Plattenmethode)
*** aus Wachstumsgeschwindigkeit nach Regeneration rückextrapoliert (CC)

Mittelwert der Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten : 2.108 h^{-1}
Standardabweichung des Mittelwertes 0.060 h

Zur Bestimmung der Absterbegeschwindigkeitskonstanten nach der Plattenmethode wurden noch zwei weitere Versuche mit 1.5 und 2.0 µg/ml CHG durchgeführt (s.Tab. 3-13).
Wie aus Abbildung 3-28 ersichtlich, verläuft die Regeneration ähnlich wie bei niedrigerer Temperatur.

Tab. 3-13 Veränderung der Keimzahl von S.aureus Kulturen in N1-Bouillon bei 37.5°C in Abhängigkeit von der CHG-Konzentration
Methode : Plattengußverfahren

Dauer der Exp.Zeit [min]	Konzentration [µg/ml] 1.500 Überlebende Keime/ml	2.000 Überlebende Keime/ml
0	$1.3x10^{4*}$	$1.7x10^{4*}$
0*	$5.2x10^{3**}$	$5.4x10^{3**}$
1	$5.1x10^{3}$	$4.9x10^{3}$
10	$2.0x10^{3}$	$1.9x10^{3}$
20	$8.4x10^{2}$	$6.8x10^{2}$
30	$3.9x10^{2}$	$2.5x10^{2}$
40	$1.5x10^{2}$	$8.4x10^{1}$

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert

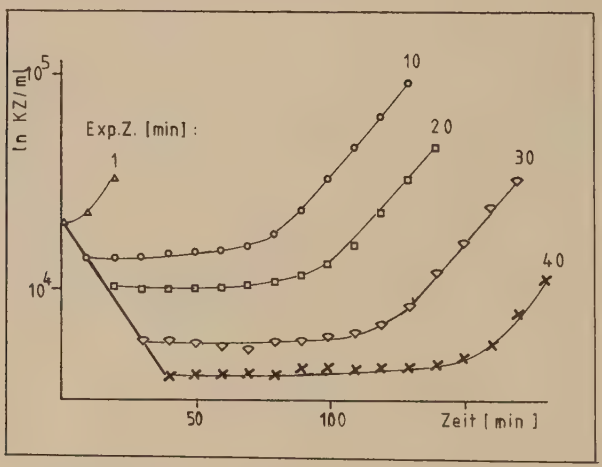


Abb.3-28 Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 1.0 µg/ml CHG bei 37.5°C

Unerwartete Ergebnisse brachte die Meßreihe bei 40°C. Ursprünglich war geplant, die gleichen Konzentrationen wie in der Versuchsserie bei 35°C einzusetzen. Die niedrige Konzentration von 0.625 µg/ml reichte bei dieser Temperatur jedoch nicht aus, um die Keime abzutöten : die Kultur wuchs mit langsamerer Geschwindigkeit exponentiell weiter. Deshalb wurde das Konzentrationsintervall nach oben um eine weitere Stufe bei 1.125 µg/ml CHG erweitert (siehe Tabelle 3-14).
Die Anfangsphase der Regeneration verlief ähnlich wie bei den niedrigeren Temperaturen (s.Abb. 3-29).

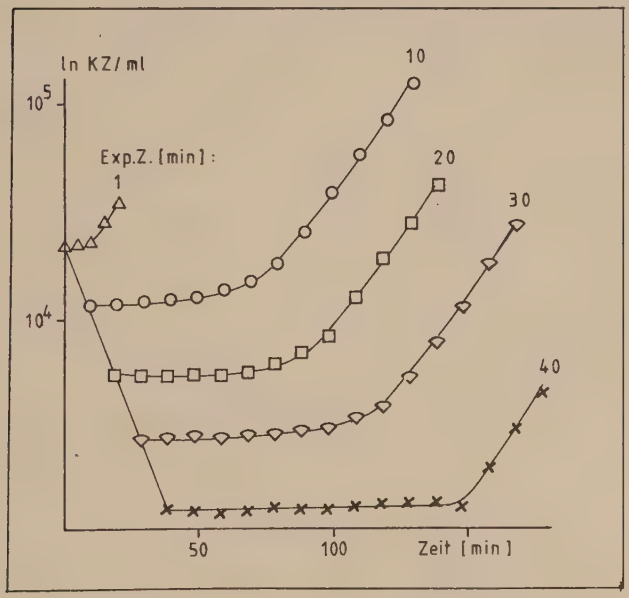


Abb. 3-29 Regeneration von S.aureus nach Behandlung mit 1.125 µg/ml CHG bei 40°C

Tab.3-14 Absterbekinetik von S.aureus in N1-Bouillon bei 40°C unter Einwirkung von CHG

Dauer der Expos. [min]	Chlorhexidingluconat-Konzentration 0.750 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	0.875 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	8.3×10^{4}*			9.9×10^{4}*		
0*	8.3×10^{4}**			1.0×10^{5}**		
1	8.2×10^{4}	7.5×10^{4}	2.66	1.0×10^{5}	7.8×10^{4}	2.50
10	6.3×10^{4}	1.3×10^{4}	2.37	7.0×10^{4}	1.0×10^{4}	2.30
20	5.0×10^{4}	1.1×10^{4}	2.30	4.9×10^{4}	7.1×10^{3}	2.34
30	3.9×10^{4}	6.0×10^{3}	2.43	3.2×10^{4}	3.9×10^{3}	2.32
40	3.0×10^{4}	4.3×10^{3}	2.36	2.3×10^{4}	2.4×10^{3}	2.41

Dauer der Expos. [min]	Chlorhexidingluconat-Konzentration 1.000 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]	1.125 µg/ml Überlebende Keime/ml Platte	CC***	Wachst. GK [h^{-1}]
0	3.3×10^{4}*			3.8×10^{4}*		
0*	3.4×10^{4}**			2.1×10^{4}**		
1	3.2×10^{4}	2.0×10^{4}	2.53	2.0×10^{4}	1.6×10^{4}	2.45
10	1.9×10^{4}	2.0×10^{3}	2.41	1.1×10^{4}	1.3×10^{3}	2.39
20	1.2×10^{4}	1.0×10^{3}	2.38	5.4×10^{3}	5.6×10^{2}	2.35
30	6.6×10^{3}	4.0×10^{2}	2.34	2.6×10^{3}	1.6×10^{2}	2.33
40	3.9×10^{3}	1.1×10^{2}	2.39	1.3×10^{3}	3.1×10^{1}	2.32

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert (Plattenmethode)
*** aus Wachstumsgeschw.keit nach Regen. rückextrapoliert (CC)

Mittelwert der Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten : 2.394 h^{-1}
Standardabweichung des Mittelwertes 0.088 h

Die zusätzliche Versuchsreihe bei 43°C wurde angesetzt, weil die Keime bei 40°C trotz Zugabe von 0.625 µg/ml CHG weiter wuchsen. Die Konzentrationen an CHG entsprachen mit 0.625, 0.750, 0.875 und 1.000 µg/ml der Meßreihe bei 35°C. Das Absterben wurde nur nach der Plattenmethode beobachtet (s.Tab. 3-15).
Mit dieser Temperatur wurde offenbar die optimale Wachstumstemperatur überschritten, die Absterbegeschwindigkeitskonstanten stiegen steil an (s.Abb. 3-31).

Tab. 3-15 Absterbekinetik von S.aureus in N1-Bouillon bei 43°C unter Einwirkung von CHG
Methode : Plattengußverfahren

	Chlorhexidingluconat-Konzentration [µg/ml]			
	0.625	0.750	0.875	1.000
Dauer der Exposition [min]	Überleb. Keime/ml	Überleb. Keime/ml	Überleb. Keime/ml	Überleb. Keime/ml
0	$2.8x10^{4*}$	$3.2x10^{4*}$	$3.0x10^{4*}$	$3.6x10^{4*}$
0*	$2.8x10^{4**}$	$3.2x10^{4**}$	$2.1x10^{4**}$	$2.1x10^{4**}$
1	$2.7x10^{4}$	$3.1x10^{4}$	$2.0x10^{4}$	$1.9x10^{4}$
10	$2.0x10^{4}$	$1.9x10^{4}$	$1.1x10^{4}$	$9.3x10^{3}$
20	$1.4x10^{4}$	$1.2x10^{4}$	$5.7x10^{3}$	$4.1x10^{3}$
30	$9.5x10^{3}$	$7.1x10^{3}$	$2.9x10^{3}$	$1.8x10^{3}$
40	$6.7x10^{3}$	$4.4x10^{3}$	$1.5x10^{3}$	$8.0x10^{2}$

* aus Anzuchtphase vorextrapoliert
** aus Absterbekinetik rückextrapoliert

Abhängigkeit der Absterbegeschwindigkeitskonstanten von den Versuchsvariablen

Die Absterbegeschwindigkeitskonstanten aus den Plattenversuchen sind in Tabelle 3-16 zusammengefaßt. Die Veränderung der Absterbegeschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von Konzentration verdeutlicht Graphik 3-31.

- Mit steigender Konzentration nimmt die Absterberate zu.
- Bei Temperaturerhöhung von 35 auf 37.5°C beschleunigt sich das Absterben bei gleicher Konservierungsmittelkonzentration.
- Steigt die Temperatur auf 40°C, so sinken die Absterbegeschwindigkeitskonstanten unter die Werte ab, die bei 35°C gefunden wurden und steigen bei weiterer Temperaturerhöhung auf 43°C wieder steil an.
- Der Anstieg der Absterberate bei gleichbleibender Temperatur und zunehmender Konservierungsmittelkonzentration ist nicht linear (s.Abb. 3-30).

Tab. 3-16 Absterberaten [h^{-1}] von S.aureus in N1-Bouillon in Abhängigkeit von Temperatur und Konservierungsmittelkonzentration
Methode : Plattengußverfahren

Temp [°C]	Konzentration an Chlorhexidingluconat [µg/ml]							
	0.500	0.625	0.750	0.875	1.000	1.125	1.500	2.000
35.0		-0.99	-1.75	-2.39	-3.32			
37.5	-0.94	-1.76	-2.65	-3.55	-4.11		-5.49	-6.24
40.0			-1.53	-2.28	-3.25	-4.15		
43.0		-2.15	-2.99	-4.01	-4.91			

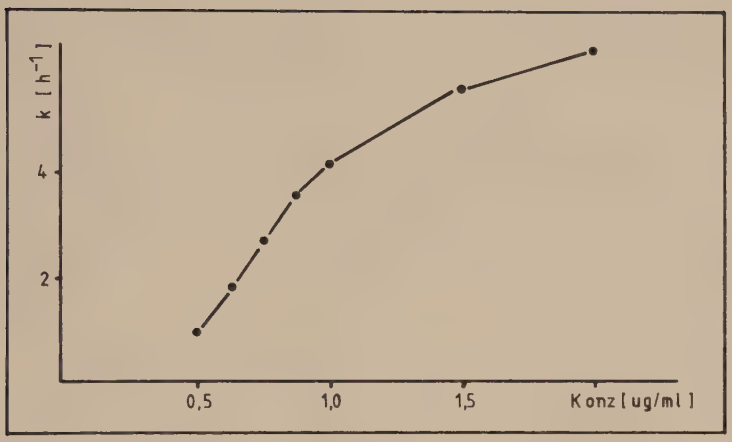


Abb. 3-30 Absterberaten von S.aureus in N1-Bouillon bei 37.5°C in Abhängigkeit von der CHG-Konzentration

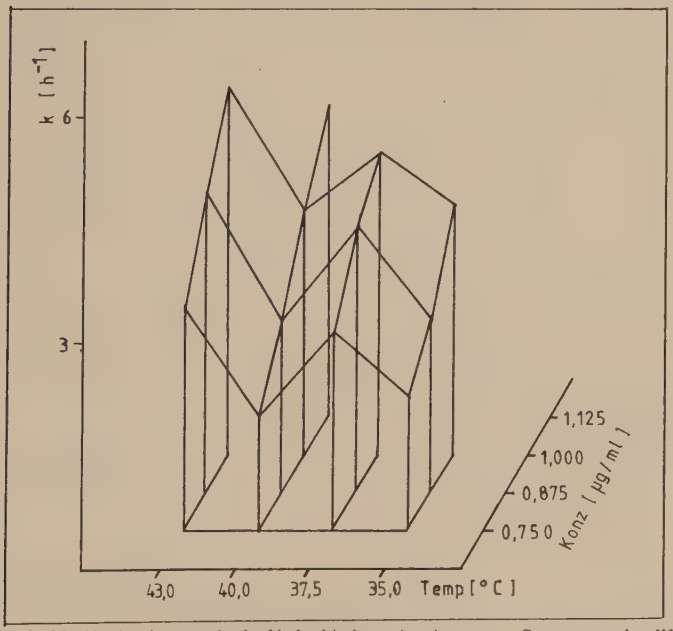


Abb. 3-31 Absterbegeschwindigkeitskonstanten von S.aureus in N1-Bouillon in Abhängigkeit von Temperatur und Konservierungsmittelkonzentration

4. AUSWERTUNG

4.1. Unterschiede zwischen den Messverfahren

Coulter Counter-Technik und Plattengußverfahren sollten nebeneinander zur gegenseitigen Kontrolle der Methoden eingesetzt werden. Wie bereits erwähnt, erfaßt man mit der Plattenmethode Lebendkeimzahlen, nach der Coulter Counter-Technik dagegen Gesamtkeimzahlen. Während die Messung nach der Plattenmethode unmittelbar nach dem Überimpfen möglich ist, muß für den Coulter Counter eine genügend hohe Keimzahl vorliegen, die erst nach einer ausreichend langen Wachstumsphase erreicht wird. Unter diesen Bedingungen kann die Ausgangskeimzahl nach der Coulter Counter Methode nur durch Extrapolation ermittelt werden.

Die extrapolierten Ausgangskeimzahlen lagen systematisch niedriger als die entsprechenden nach der Plattenmethode beobachteten. Die Differenz wuchs mit steigender Konzentration und Expositionszeit. Der erste Versuch, Lebendkeimzahlen durch Extrapolation logarithmischen Wachstums zu bestimmen, stammt von Seydel und Wempe (34). In einigen Fällen, z.B. bei einem Nitrofuranderivat, war das problemlos möglich, in anderen, z.B. bei Tetracyclin, lagen die Plattenwerte anfangs über und später unter den entsprechenden der Coulter Counter- Technik. Diese Abweichungen führte Seydel auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen zurück.

Unterschiede im Verlauf der Regeneration, die vom Konservierungsmittel abhingen, ließen darauf schließen, daß CHG und BAC verschiedene Wirkungsmechanismen haben. Nach der Einwirkung von CHG blieben die Lebendkeimzahlen bis zum Beginn der erneuten logarithmischen Wachstumsphase konstant. Während die Keime nach hoher BAC-Konzentration und langer Expositionszeit zu Beginn mehr oder weniger langsam abstarben und anschließend allmählich in die logarithmische Wachstumsphase übergingen.

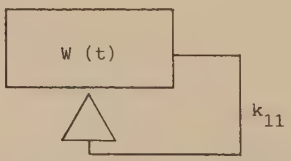
Ist bei BAC die Regenerationsphase durch die Überlagerung des Absterbens stark geschädigter Keime mit einem langsamen Beginn der Vermehrung weniger betroffener Organismen gekennzeichnet, so ist

der Verlauf für CHG nicht eindeutig interpretierbar. Einerseits ist denkbar, daß sich die Keime in einer echten Ruhephase befinden, andererseits könnten sich Absterben und Vermehrung in ihrem Effekt aufheben.
Daneben ist noch eine weitere Interpretation denkbar. Qualitativ ähnliche Daten, wie die beobachteten, wären zu erwarten, wenn BAC-geschädigte Keime in der Inaktivierungsbouillon ungünstige Lebensbedingungen vorfinden, während auf dem Agar auch solche Keime überleben, die bei längerem Aufenthalt in der Inaktivierungsbouillon absterben. Andererseits wäre die Beobachtung der Regeneration nach Behandlung mit CHG auch so zu erklären, daß die Überlebensbedingungen der Keime auf der Platte schlechter sind als in der Inaktivierungsbouillon. Dagegen spricht, daß Keime bei Regeneration in N1-Bouillon weniger überlebensfähig sind als in Nortons Bouillon (s. Abschnitt 3.6.2.1., Seite 54).
Eine quantitative Interpretation der Wachstumsverläufe ist mit Hilfe von kinetischen Modellen möglich, wie sie Feldmann (9) in die Mikrobiologie eingeführt hat.

4.2. Kinetische Modelle mit Übergängen erster Ordnung

Kompartimentmodelle sind vereinfachte Abbilder komplexer Systeme, bei denen stetige Übergänge durch scharfe Grenzen ersetzt werden. Dabei werden in einem Kompartiment alle Keime zusammengefaßt, die ähnliche Eigenschaften aufweisen und von den Subpopulationen der anderen Kompartimente unterschieden werden können. Dabei geht man davon aus, daß die Übergänge zwischen den Kompartimenten von erster Ordnung sind und nur in einer Richtung erfolgen. Diese Annahme ist zwar empirisch begründet, weil die Abläufe experimentell nicht zugänglich sind, sie erscheint aber gerechtfertigt, da für Wachstum und Absterben ebenfalls ein Vorgang von erster Ordnung beobachtet wird.

Während Feldmann Interphase- und Mitosekompartimente unterscheidet, werden in dieser Arbeit unterschiedliche Phasen der Regeneration betrachtet.
Legt man den Modellen den Zellzyklus zugrunde, so sterben die Keime in der Regel während des Teilungsvorganges ab. Das ist mit den experimentellen Befunden bei Einwirkung von Konservierungsmitteln nicht in Einklang zu bringen. Die Mitosephase beträgt 5-10% der gesamten Zyklusdauer. Bei einer Generationszeit von 20 Minuten dürfen demnach in 60 Sekunden maximal 5% der Keime absterben. Bei Einwirkung von 0.8 µg/ml BAC bei 40°C reduziert sich die Keimzahl in den ersten 60 Sekunden um 50% (s.Tab. 3-9, S. 56). Diese Annahme gilt für den Keimtod unter Konservierungsmitteleinwirkung demnach nicht und wird den Modellen nicht zugrunde gelegt.
Das einfachste denkbare Kompartiment-Modell eignet sich zur Beschreibung des exponentiellen Wachstums. Alle Mikroorganismen teilen sich mit konstanter Teilungsrate. Jede Tochterzelle überlebt, geht mit dem Alter Null in die Population ein und verbleibt dort bis zur nächsten Teilung (s.Abb. 4-1).



W(t) Zellen zum Zeitpunkt t im Kompartiment des Wachstums
k_{11} Wachstumsrate
Abb. 4-1 Darstellung des exponentiellen Wachstums

Die Veränderung der Keimzahl wird durch die Differentialgleichung 4-1 beschrieben :

$$\frac{dW}{dt} = k_{11} W(t) \qquad \text{Gl. 4-1}$$

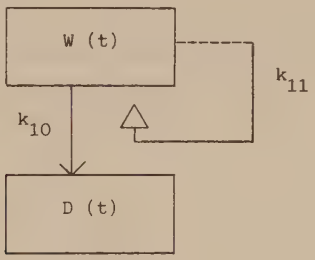
$\frac{dW}{dt}$ Wachstumsgeschwindigkeit
W(t) Keime zur Zeit t im Kompartiment W
k_{11} Wachstumsgeschwindigkeitskonstante

Integriert ergibt sich für das Wachstum die klassische Exponentialfunktion (Gl. 4-2) :

$$W = W_0 \; e^{k_{11} \, t} \qquad \text{Gl. 4-2}$$

Dieses Modell ist eng begrenzt und kann nur das Wachstum junger und gesunder Populationen beschreiben. Das Ein-Kompartiment-Modell gibt z.B. die Keimvermehrung vor Zugabe des Konservierungsmittels wieder.

Verteilt man in einer logarithmisch wachsenden Kultur eine ausreichende Menge antibakterieller Substanz, so stirbt pro Zeiteinheit ein konstanter Anteil der Keime ab. Der Vorgang kann durch das folgende Modell beschrieben werden (s.Abb. 4-2) :



W(t) lebende Keime im Kompartiment W zur Zeit t
D(t) tote Keime im Kompartiment D zur Zeit t
k_{11} Wachstumsrate
k_{10} Mortalitätsrate

Abb. 4-2 Keimtod unter dem Einfluß von Noxen

Der Differentialquotient 4-3 beschreibt die Keimabnahme im Kompartiment W :

$$- \frac{dW}{dt} = (k_{11} - k_{10}) \; W(t) \qquad \text{Gl. 4-3}$$

W(t) Zellen zur Zeit t im Kompartiment W
k_{11} Wachstumsrate
k_{10} Mortalitätsrate
$- \frac{dW}{dt}$ Absterbegeschwindigkeit

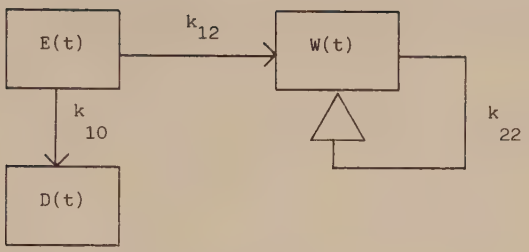
Die absolute Veränderung der Lebendkeimzahl im Kompartiment W ist :

$$W = W_0 \; e^{(k_{11} - k_{10})\, t} \qquad \text{Gl. 4-4}$$

Nach Gleichung 4-4 sind 3 Möglichkeiten der Keimzahlveränderung denkbar.

- Es sterben pro Zeiteinheit weniger Keime ab, als durch Vermehrung hinzu kommen, das heißt, die Absterbegeschwindigkeitskonstante ist kleiner als die Wachstumsgeschwindigkeitskonstante und die Kultur wächst logarithmisch weiter, wenn auch unter Umständen langsam.
- Werden im Zeitintervall genauso viele Keime abgetötet, wie aus Teilungen entstehen, wenn also die Absterbegeschwindigkeitskonstante gleich der Wachstumsgeschwindigkeitskonstante ist, dann stagniert die Keimzahl.
- Sterben mehr Keime ab, als neu hinzukommen, oder stellen die Keime jegliches Wachstum ein, wird die Absterbegeschwindigkeitskonstante größer als die Wachstumsgeschwindigkeitskonstante und die Kultur stirbt exponentiell ab.

Eine rasche Initialphase kann durch dieses Modell nicht dargestellt werden. Bereits eine Minute nach Zugabe des Konservierungsmittels verlief aber die Abnahme der Keimzahl in allen Fällen exponentiell, das heißt, die Absterberate war größer als die Wachstumsrate. Unmittelbar nach dem Überimpfen aus einer konservierungsmittelhaltigen Lösung befinden sich die Keime unabhängig von der Schwere ihrer Schädigung im Eingangskompartiment E. In diesem Zustand vermehren sie sich nicht. Sie verlassen dieses Kompartiment auf zwei Wegen : schwergeschädigte Keime sterben ab, die besonders in Mitleidenschaft gezogenen sterben zuerst. Weniger betroffene Keime überleben und gehen in eine neue Wachstumsphase über, sobald die Schäden weitgehend behoben sind. Der Anteil überlebender Keime wird niedriger, wenn Konzentration und Expositionszeit ansteigen. Das entsprechende Kompartiment-Modell kann man durch folgendes Schema veranschaulichen :



E(t) Zellen zur Zeit t im Kompartiment E
W(t) Zellen zur Zeit t im Kompartiment W
D(t) Zellen zur Zeit t im Kompartiment D
k_{ij} Übergangsraten zwischen den Kompartimenten

Abb. 4-3 Regeneration der Keime nach Konservierungsmittelexposition Modell I

Die entsprechenden Veränderungen der Keimzahl werden im einfachsten Fall durch die Differentialgleichungen 4-5 bis 4-7 beschrieben :

$$-\frac{dE}{dt} = (k_{10} + k_{12})\ E \qquad \text{Gl. 4-5}$$

$$\frac{dW}{dt} = k_{12}\ E + k_{22}\ W \qquad \text{Gl. 4-6}$$

$$\frac{dD}{dt} = k_{10}\ E \qquad \text{Gl. 4-7}$$

Dieses Gleichungssystem kann besonders einfach mit Hilfe der Laplace-Transformation (76) gelöst werden.

Kennzeichnet man allgemein eine zeitabhängige Größe mit F(t), so bezeichnet man ihre Laplace-Transformation mit:

$$L\left\{F(t)\right\} = f(s) \qquad \text{Gl.4-8}$$

Die Transformation ist definiert als :

$$f(s) = \int_{0}^{\infty} F(t)\ e^{-st}\ dt \qquad \text{Gl.4-9}$$

Für Differentialgleichungen gilt :

$$L\left\{\frac{dF(t)}{dt}\right\} = s\ f(s) - F_0 \qquad \text{Gl.4-10}$$

Die Lösung des Differentialgleichungssytems findet man, indem das System im Transformationsbereich gelöst und in den Zeitbereich zurücktransformiert wird.
Die Gleichung 4-8 geht bei Transformation über in Gl.4-11 :

$$L\left\{\frac{dE}{dt}\right\} = s\ e(s) - E_0 = -(k_{10} + k_{12})\ e(s) \qquad \text{Gl.4-11}$$

Durch Umformen kommt man zu Gl. 4-12 :

$$e(s) = \frac{E_0}{(s + k_{10} + k_{12})} \qquad \text{Gl.4-12}$$

Diese Form der Gleichung kann mit Hilfe einer Korrespondenztabelle rücktransformiert werden. Man erhält :

$$L^{-1}\left\{e(s)\right\} = E = E_0\ e^{-(k_{10} + k_{12})\ t} \qquad \text{Gl.4-13}$$

Dementsprechend kann Gleichung 4-9 transformiert werden zu :

$$L\left\{\frac{dW}{dt}\right\} = s\ w(s) - W_0 = k_{12}\ e(s) + k_{22}\ w(s) \qquad \text{Gl.4-14}$$

Zum Zeitpunkt des Überimpfens sind keine teilungsfähigen Keime vorhanden, deshalb ist W_0 gleich Null. Die Gleichung 4-12 kann in 4-14 eingesetzt werden. Damit gilt :

$$s\ w(s) = \frac{k_{12}\ E_0}{(\ s + k_{10} + k_{12}\ )} + k_{22}\ w(s) \qquad \text{Gl.4-15}$$

Einen Ausdruck dieser Form kann in eine Summe zerlegt werden und man erhält :

$$\frac{k_{12}\ E_0}{(s + k_{10} + k_{12})\ (s - k_{22})} = \frac{A}{(s + k_{10} + k_{12})} + \frac{B}{(s - k_{22})} \qquad \text{Gl.4-16}$$

Die zunächst unbekannten Zähler, A und B, erhält man, indem nacheinander s der Wert $(-k_{10} - k_{12})$ und $+k_{22}$ zugewiesen wird, nachdem mit $(s+k_{10}+k_{12})$ bzw $(s-k_{22})$ durchmultipliziert und gekürzt wurde.
Dann erhält man für A :

$$A = \frac{k_{12}\ E_0}{(-k_{10} - k_{12} - k_{22}\ )} \qquad \text{Gl.4-17}$$

bzw für B :

$$B = \frac{k_{12}\ E_0}{(k_{10} + k_{12} + k_{22}\ )} \qquad \text{Gl.4-18}$$

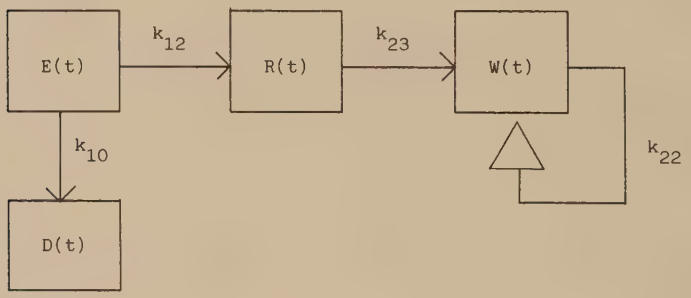
Die beiden Gleichungen werden in 4-16 eingesetzt :

$$w(s) = \frac{k_{12}\ E_0}{(-k_{10}-k_{12}-k_{22})\ (s+k_{10}+k_{12})} + \frac{k_{12}\ E_0}{(+k_{10}+k_{12}+k_{22})\ (s-k_{22})} \qquad \text{Gl.4-19}$$

Bei der Rücktransformation erhält man :

$$W = \frac{k_{12}\ E_0}{(-k_{10}-k_{12}-k_{22})}\ e^{-(k_{10}+k_{12})\ t} + \frac{k_{12}\ E_0}{(k_{10}+k_{12}+k_{22})}\ e^{+k_{22}\ t} \qquad \text{Gl.4-20}$$

Die Lebendkeimzahl, die nach der Plattenmethode bestimmt wird, entspricht dann zu jeder Zeit der Summe von E und W (Gl.4-13/4-20). Bei der Auswertung der experimentellen Daten zeigte sich, daß dieses einfache Modell bei langer Expositionszeit und hoher Konzentration nicht in der Lage war, den Verlauf der Lebendkeimzahlen in jedem Fall angemessen darzustellen. Es erwies sich als notwendig, ein weiteres Kompartiment einzuführen, in dem mäßig bis leicht geschädigte Keime nach dem Verlassen von E eine Zeit lang verweilen und ihre Schäden reparieren, bevor sie wieder beginnen, sich zu teilen. Das Schema des erweiterten Regenerationsmodells ist in Abb.4-6 gegeben.



E(t) Keime zur Zeit t im Kompartiment E
R(t) Keime zur Zeit t im Kompartiment R
W(t) Keime zur Zeit t im Kompartiment W
k_{ij} entsprechenden Übergangsraten

Abb. 4-6 Regeneration stark geschädigter Keime
Modell II

Es gelten folgende Differentialgleichungen :

$$\frac{dE}{dt} = -(k_{10} + k_{12})\, E(t) \qquad \text{Gl. 4-21}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_{12}\, E(t) + k_{23}\, R(t) \qquad \text{Gl. 4-22}$$

$$\frac{dW}{dt} = k_{23}\, R(t) + k_{33}\, W(t) \qquad \text{Gl. 4-23}$$

$$\frac{dD}{dt} = k_{10}\, D(t) \qquad \text{Gl. 4-24}$$

Das Differentialgleichungssystem wurde wieder durch Laplace-Transformation gelöst (s.Anhang A).
Die Geschwindigkeitskonstanten des einfachen Regenerationsmodells I und des erweiterten Modells II wurden aus den nach der Plattenmethode bestimmten Lebendkeimzahlen während der Regenerationsphase durch nichtlineare Regression nach dem Verfahren nach Nelder-Mead berechnet (77).

4.3. Verzögerungsmodell

Betrachtet man den Verlauf der Regeneration nach Behandlung mit CHG (s.Abb. 3-29), so bietet sich eine andere Interpretation als Alternative zu den Kompartiment-Modellen an. Anstelle der Annahme, daß die Übergänge zwischen Kompartimenten nur Prozesse erster Ordnung sind, kann man auch davon ausgehen, daß die Keime erst mit der Teilung beginnen, wenn die durch das Konservierungsmittel verursachten Schäden behoben sind. Die Wiederherstellung der Teilungsfähigkeit ist bei allen gleich geschädigten Organismen etwa zum gleichen Zeitpunkt abgeschlossen, so daß die Teilung aller Keime ($LKZ_{i,0}$) fast gleichzeitig aber mit Verzögerung (t_{lag}) beginnt. Im einfachsten Fall, wenn keine Bakterien zu Beginn der Regenera- absterben, gilt dann folgende Gleichung für die Lebendkeimzahl als Funktion der Zeit :

$$LKZ = \begin{cases} LKZ_{i,0} & t \leq t_{lag} \\ LKZ_{i,0}\, e^{k_i (t - t_{lag})} & t \geq t_{lag} \end{cases} \qquad \text{Gl. 4-25}$$

Für die Regeneration der Staphylococcen nach längerer Einwirkung von BAC ist dieses einfache Modell nicht geeignet, weil das vorrübergehende Absinken der Lebendkeimzahl so nicht dargestellt werden kann. Geht man davon aus, daß das Absterben während der Regeneration ein Vorgang nach erster Ordnung ist, so muß das Modell erweitert werden. Die Zahl der Keime, die durch sehr schnelles Überimpfen auf dem Agar noch zur Koloniebildung gebracht werden kann, kann in zwei Anteile geteilt werden : stark geschädigte Keime (LKZ_D), die bei weiterem Verbleiben in der Inaktivierungsbouillon absterben, und weniger stark geschädigte Organismen (LKZ_V), die in der Suspensionskultur überleben werden. Dieses Verhalten kann durch folgende Gleichung beschrieben werden :

$$LKZ = \begin{cases} LKZ_D\, e^{-k_D t} + LKZ_V & t \leq t_{lag} \\ LKZ_D\, e^{-k_D t} + LKZ_V\, e^{k_i (t - t_{lag})} & t \geq t_{lag} \end{cases} \qquad \text{Gl. 4-26}$$

Eine einheitliche Darstellung von Übergangsgeschwindigkeitskonstanten und zeitlichen Verzögerungen ist möglich mit Hilfe der Theorie der Verweilzeitverteilungen aus der hier nur der Begriff der mittleren Verweilzeit (MVZ) eingeführt werden soll (78). Betrachtet man ein Kollektiv von Objekten, die sich in einem bestimmten Zustand oder Kompartiment befinden, und nimmt die Aufenthaltszeit jedes Individuums, so ist die mittlere Verweilzeit gleich dem arithmetischen Mittel aller Einzelverweilzeiten. Bei einer Ver-

zögerungszeit (t'_{lag}) ist die Breite der Verteilung gleich Null und damit die MVZ gleich der Verzögerungszeit. Bei Übergängen erster Ordnung entspricht die MVZ dem reziproken Wert der Geschwindigkeitskonstanten. Die mittleren Verweilzeiten aufeinanderfolgender Kompartimente verhalten sich additiv, deshalb sind sie nicht nur geeignet, einen einfachen Prozess zu beschreiben, sondern auch Reihen aufeinanderfolgender Vorgänge.

Bei vielen technischen und biologischen Systemen sind die MVZ ein gutes Mittel, um komplex zusammengesetzte Prozesse zu kennzeichnen. Um das Verhalten von Keimen in der Regenerationsphase zu beschreiben, eignen sie sich nur bedingt. Entscheidend für den Beginn des logarithmischen Wachstums sind nur die ersten Keime, die wieder zur Zellteilung übergehen.

Bei den Versuchen verhielten sich die Ausgangskeimzahlen der Regenerationsbouillons nach 10 bis 40 Minuten Expositionszeit maximal wie 1:10, das ist für mikrobiologische Versuche eine relativ geringe Spannweite. Deshalb schien es zweckmäßig, anstelle der MVZ den Zeitpunkt anzugeben, an dem 1% der Ausgangskeimzahl wieder in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten ist. Diese Zeit wurde mit $t_{1\%}$ bezeichnet.

Im einfachen Modell I entspricht $t_{1\%}$ dem Zeitpunkt, zu dem noch 99% der Keime im Eingangskompartiment E sind, während 1% in das Kompartiment W übergingen. Demnach gilt für $t_{1\%}$:

$$99\% = 100\% \; e^{-k_{12} \, t_{1\%}} \qquad \text{Gl. 4-27}$$

Durch Umformen erhält man :

$$t_{1\%} = \frac{\ln 0.99}{-k_{12}} \qquad \text{Gl. 4-28}$$

Für das erweiterte Modell kann die in Anhang B abgeleitete Gleichung zur Bestimmung von $t_{1\%}$ verwendet werden :

$$N_W = LKZ_V \left[\frac{1}{k_{12}k_{23}} - \frac{1}{(k_{23}-k_{12})} \left(\frac{1}{k_{12}} e^{-k_{12} t_{1\%}} - \frac{1}{k_{23}} e^{-k_{23} t_{1\%}} \right) \right] \qquad \text{Gl. 4-29}$$

N_W Zahl der Keime, die in die Wachstumsphase übergegangen sind
LKZ_V lebensfähige Keime

Die Gleichung läßt sich nicht explizit nach der Zeit lösen, sondern der gesuchte Wert wird über eine Nullstellensuche gefunden.

4.4 Grundlagen zur Beurteilung der Kurvenanpassung

Die Auswahl des besten kinetischen Modells ist nicht trivial. Die Entscheidung kann mit Hilfe statistischer und inhaltlicher Kriterien getroffen werden. Zu den statistischen Gesichtspunkten, die zuerst besprochen werden sollen, gehören die Güte der Übereinstimmung zwischen der bestangepaßten Modellfunktion und den Meßwerten, Bestimmtheitsmaße der geschätzten Modellkonstanten und Zufälligkeit der Streuung um die Regressionskurve. Zu den inhaltlichen Kriterien zählen die Interpretierbarkeit der Modellparameter im Sinne der biologischen Vorgänge, ihre Reproduzierbarkeit bei Wiederholung der Experimente und ein sinnvoller Zusammenhang mit den Versuchsvariablen.
Kinetische Modelle sollen so einfach wie möglich sein, ohne daß eine zu starke Vereinfachung zu systematischen Fehlern in der Anpassung führt. Bei zu komplizierten Modellen können einige Parameter nicht mehr befriedigend aus den Daten bestimmt werden und der Rechenaufwand steigt, ohne daß eine signifikante Verbesserung der Kurvenanpassung erreicht wird.

Die Abweichungen zwischen gemessenen Werten (y) und den entsprechenden Schätzwerten der bestangepaßten Modellfunktion ($\hat{y}$) werden als Residuen bezeichnet. Das einfachste Maß für die Güte der Anpassung, das aber auch von der Zahl der Meßwerte (n) abhängt, und bei dem die Anzahl der Versuchsparameter (p) nicht berücksichtigt wird, ist die Summe der Residuenquadrate :

$$SSQ = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad . \qquad \text{Gl. 4-30}$$

Ähnliches gilt für die Größe Chi-Quadrat :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(\hat{y}_i - y_i)^2}{y_i} \quad . \qquad \text{Gl. 4-31}$$

Boxenbaum, Riegelman und Elashoff (79) schlagen zur Beurteilung pharmakokinetischer Modelle eine Variante des F-Testes vor. Sie bilden aus der Summe der Fehlerquadrate die Prüfgröße F :

$$F = \frac{SSQ_j - SSQ_k}{SSQ_k} \cdot \frac{f_k}{f_j - f_k} \qquad \text{Gl. 4-32}$$

SSQ_j Summe der Fehlerquadrate des Modells mit p_j Parametern
SSQ_k Summe der Fehlerquadrate des Modells mit p_{j+i} Parametern
f_k Zahl der Freiheitsgrade des Modells$_k$: $f_k = n - p_{j+i}$
f_j Zahl der Freiheitsgrade des Modells$_j$: $f_j = n - p_j$

Der nach Gl. 4-28 berechnete Ausdruck wird mit dem tabellierten Wert für f_k und f_j Freiheitsgrade und einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0.05$ verglichen. Die Arbeitshypothese, daß das komplizierte Modell mit p_k Parametern signifikant besser ist, wird angenommen, wenn der tabellierte Wert kleiner ist als der Funktionswert.

Auf der 'maximum-likelihood'-Parameterschätzung beruht die Auswahl nach dem Akaikeschen Informationskriterium (AIC) (80), das wie folgt berechnet wird :

$$AIC = n \ln (SSQ_{min}) + p \qquad \text{Gl. 4-33}$$

n	Anzahl der Meßwerte
SSQ_{min}	Minimum der Summe der Fehlerquadrate
p	Anzahl geschätzter Parameter

Der Zahlenwert dieses Ausdrucks sollte möglichst klein werden. Beim Vergleich zweier Modelle mit gleicher Summe der Fehlerquadrate wird das Modell mit niedrigerer Parameterzahl bevorzugt. Der Vorteil dieser Methode ist, daß statistische Tabellenwerte nicht benötigt werden.

Nicht nur die Größe der Fehler, sondern auch die Art, in der sie um den Funktionswert streuen, ist für die Beurteilung von Bedeutung. Auf Abweichungen, die systematisch mit der Zeit zusammenhängen, kann man am einfachsten graphisch schließen. Bei der Residuengraphik (81) werden die Differenzen zwischen den Meßwerten und den entsprechenden Schätzwerten der Modellfunktion gegen die Zeit aufgetragen. Wenn die Werte nicht in zufälliger Form um die Nullinie streuen, muß das Modell in geeigneter Weise ergänzt werden. Die Verbesserung der Residuen von Modell I zu Modell II ist in Abb. 4-7 am Beispiel der Regeneration von S.aureus bei 37.5°C in Nortons Bouillon nach 10 Minuten Exposition mit 0.8 µg/ml BAC gezeigt.

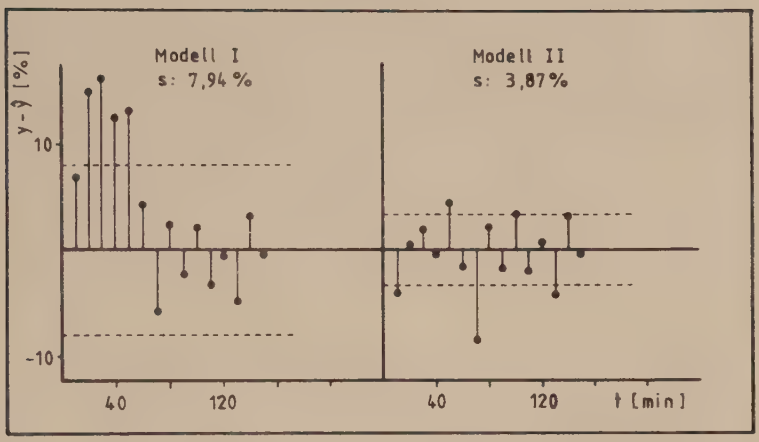


Abb. 4-7 Residuengraphik für die Abweichungen der Schätzwerte von den Meßwerten für die Anfangsphase der Regeneration von S.aureus bei 37.5°C in Nortons Bouillon nach Schädigung mit 0.8 µg/ml BAC über 10 Minuten
------- Standardabweichung der Residuen

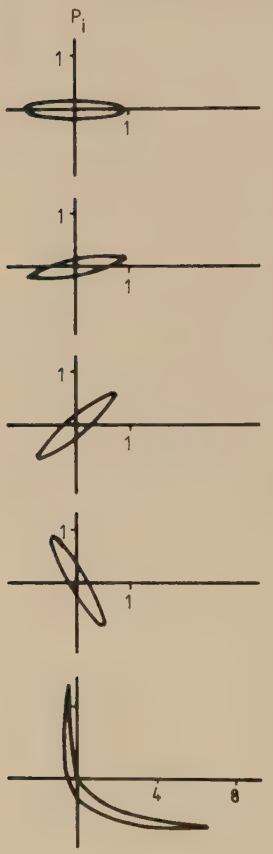
Werden einfachen Kurven zu komplizierte Systeme zugrunde gelegt, so können die Parameter nicht mit guter Genauigkeit geschätzt werden. Die Zuverlässigkeit der Parameterschätzung und ihre gegenseitige Abhängigkeit kann über Konfidenzkonturen (82) ermittelt werden. Hierbei untersucht man die Summen der Fehlerquadrate in der Umgebung des Minimums und stellt sie graphisch dar. Dazu werden die Parameterwerte P_j und P_k zunächst wie folgt transformiert :

$$P_j = \frac{P_j - P_{j\,min}}{P_{j\,min}} \qquad \text{Gl. 4-34}$$

$$P_k = \frac{P_k - P_{k\,min}}{P_{k\,min}} \qquad \text{Gl. 4-35}$$

Durch diese Umrechnung können die Konturen leicht miteinander verglichen werden, selbst wenn die Parameter unterschiedlicher Grössenordnung sind.
Die räumliche Darstellungen von mehreren Varibalen ist auf höchstens drei Parameter im dreidimensionalen Raum beschränkt. Im Interesse einer einfachen graphischen Darstellung wird die Abhängig-

keit der Summe der Fehlerquadrate von jeweils zwei Modellkonstanten betrachtet. Bei einem Modell mit p Parametern spricht man von einem p-dimensionalen Parameterraum. Der Vertrauensbereich ist ein ebenfalls räumliches Gebilde, durch das die dargestellten Konturen jeweils Schnitte darstellen.
Die Form der Kontur läßt Aussagen über die Zuverlässigkeit der Parameterschätzung zu (s.Abb. 4-8).



die Schätzungen sind unabhängig voneinander, dabei kann P_i genauer ermittelt den als P_j

bei schwach positiver Korrelation kann P_i genauer geschätzt werden als P_j

bei positiver Korrelation ist die Schätzung von P_i und P_j annähernd gleich genau

negative Korrelation

hyperbolische Korrelation

Abb. 4-8 Konfidenzkonturen, die in der Auswertung beobachtet wurden

4.5. Vergleich der Modelle I bis III

Die beobachteten Regenerationsverläufe wurden über nichtlineare Regression an die in den Abschnitten 4.2 und 4.3 entwickelten kinetischen Modelle angepaßt. Über die Güte der Anpassung und die Konsistenz der berechneten Parameterwerte wurde die Zweckmäßigkeit der Modelle beurteilt. In dem Modell III mit Verzögerungszeit wurde die Zahl der Keime, die in der Regenerationsbouillon noch absterben (LKZ_D) gleich Null gesetzt, wenn zu Beginn der Regeneration kein Absterben beobachtet wurde.

Neben den Geschwindigkeitskonstanten, $t_{1\%}$ und t_{lag} wurde noch der Anteil überlebender Keime aus den Modellen I und II angegeben. Er kann aus den Geschwindigkeitskonstanten der Vorgänge berechnet werden, die aus dem Eingangskompartiment herausführen. Dort verringert sich die Zahl der Keime in einem Vorgang erster Ordnung, dessen Geschwindigkeitskonstante gleich der Summe der Absterbe- und Übergangsrate ist. Die Anteile der Keime, die den undifferenzierten Ausgangszustand auf den Übergangswegen verlassen, verhalten sich wie die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten. Deshalb gilt für die Anzahl der Keime, die insgesamt überleben :

$$LKZ_V = LKZ_0 \frac{k_{12}}{k_{12} + k_{10}} \qquad \text{Gl. 4-36}$$

Die Differenz zwischen der Ausgangskeimzahl und dem Anteil überlebender Keime entspricht der Zahl der Keime, die in der Suspensionskultur absterben :

$$LKZ_D = LKZ_0 - LKZ_V = LKZ_0 \frac{k_{10}}{k_{10} + k_{12}} \qquad \text{Gl. 4-37}$$

4.5.1. Benzalkoniumchlorid

Statistische Beurteilung der Anpassungsgüte

Die Güte der Kurvenanpassung war für Modell I und II vergleichbar, die Summe der Fehlerquadrate für das zweite Modell in jedem Fall kleiner. Wenn die Keimzahl nach dem Überimpfen stagnierte oder leicht anstieg, waren die Abweichungen geringfügig. Sie waren deutlicher ausgeprägt, wenn die Keimzahlen abnahmen (s. Abb. 4-9). Das Verzögerungsmodell eignete sich weniger, um den Verlauf der Regeneration zu beschreiben (statistische Daten : s. Anhang C). Der Vergleich der Modelle I und II aufgrund des F-Testes und des Informationskriteriums nach Akaike ließ nicht den Schluß zu, daß ein Modell deutlich überlegen ist. Die Entscheidung aufgrund der beiden Kriterien wird nicht einheitlich getroffen. Der F-Test bevorzugt im Zweifelsfall das einfachere Modell I, während nach der 'maximum-likelihood-Schätzung' eher das kompliziertere zweite Modell gewählt wird.

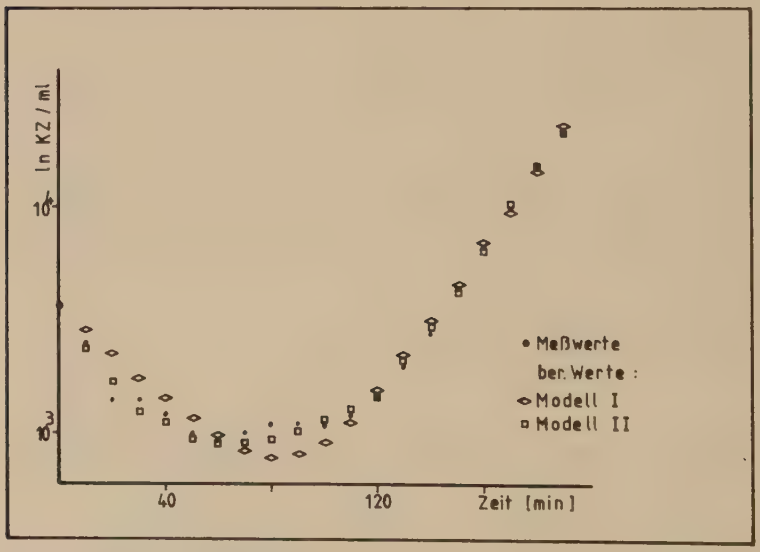


Abb. 4-9 Kurvenanpassung für die Regeneration von S.aureus nach 40 Minuten Exposition mit 0.8 µg/ml BAC bei 37.5°C

Eine, allerdings nicht zahlenmäßig auswertbare, Prüfung auf systematische Fehler ist mit Hilfe der Residuengraphen möglich. In der Regel zeigte sich, daß eine vollkommen zufällige Streuung nur selten gegeben war. Beim Übergang von Modell I auf Modell II änderte sich die Richtung der Abweichung nicht, wohl aber ihr Ausmaß (s. Abb. 4-10). Ein Gegenbeispiel zeigt Abb. 4-7, dort ist die Verbesserung der Kurve nach 10 Minuten Expositionszeit gut sichtbar.

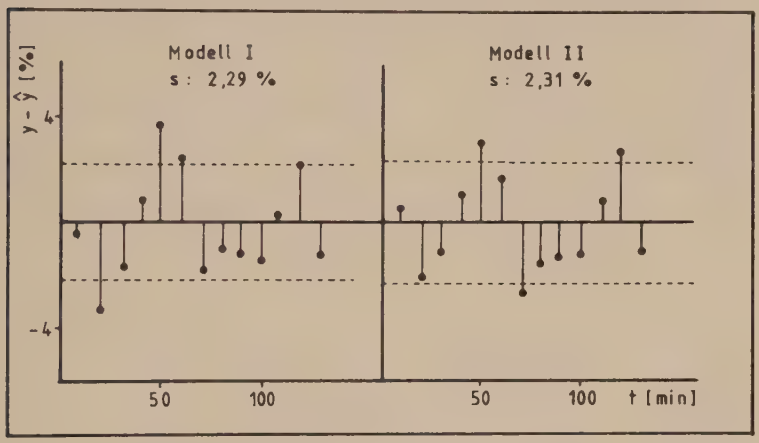
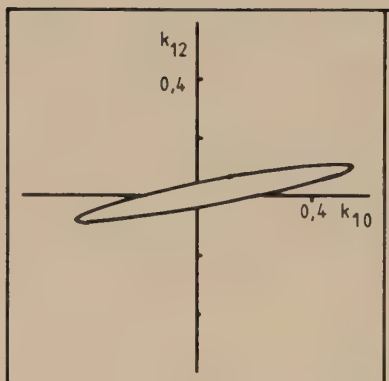


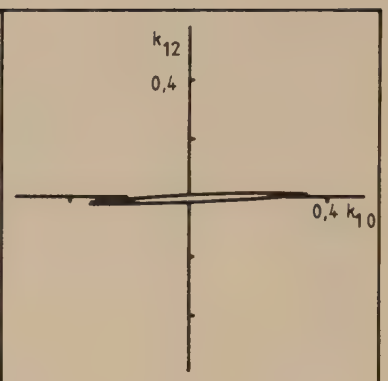
Abb. 4-10 Residuengraphik für die Kurvenanpassung an den Verlauf der Regeneration von S.aureus nach 20 Minuten Exposition (0.8 µg/ml BAC bei 37.5°C)
---------- Standardabweichung der Residuen

Die Sicherheit der Parameterschätzung kann aufgrund der Konfidenzkonturen beurteilt werden.

In der Regel läßt sich die Wachstumsgeschwindigkeit mit hoher Präzision schätzen. Im Modell I sind die Übergangsgeschwindigkeitskonstanten der Prozesse, die aus den Eingangskompartimenten herausführen, k_{10} und k_{12}, in der Regel statistisch voneinander abhängig, die Abhängigkeit ist aber nicht sehr ausgeprägt (s.Abb.4-11).

In Modell II sind die Übergangsraten des Zwischenkompartimentes R, k_{12} und k_{23}, hoch nichtlinear korreliert (s.Abb. 4-12).





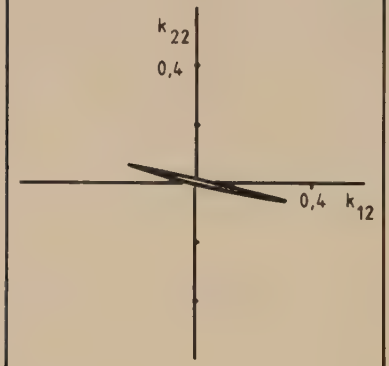


Abb. 4-11
Konfidenz-Konturen
Modell I

Temp.:	37,5°C
Konz.:	0,9 µg/ml BAC
Exp.Zeit:	10 Min
α :	0,05
SSQ_{min} :	347
SSQ_{Cont} :	695

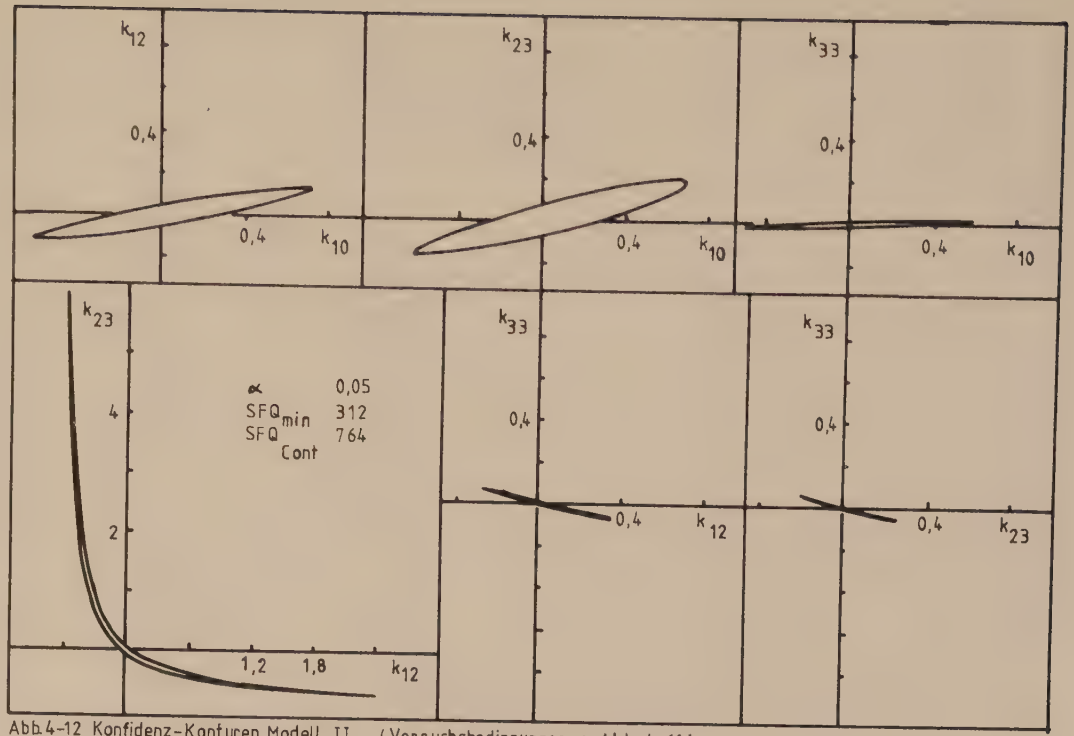


Abb. 4-12 Konfidenz-Konturen Modell II (Versuchsbedingungen s. Abb. 4-11)

Abhängigkeit der Versuchsparameter von den Versuchsvariablen

Während sich mit Hilfe der statistischen Kriterien keine eindeutige Beziehung zwischen dem optimalen Modell und den Versuchsbedingungen erkennen ließ, waren konsistente Zusammenhänge zwischen Versuchsvariablen und Modellparametern offensichtlich vorhanden. Unabhängig von Expositionszeit und Konservierungsmittelkonzentration streuten die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten wenig. Die Absterbegeschwindigkeitskonstanten wurden bei zunehmender Schädigungsdauer und Konservierungsmittelkonzentration erwartungsgemäß größer und die Übergangsgeschwindigkeitskonstanten kleiner, entsprechend nahm der Anteil überlebender Keime ab. Dazu paßt, daß $t_{1\%}$ bei längerer Expositionszeit ansteigt (s.Tab. 4-1/2, Abb. 4-13).

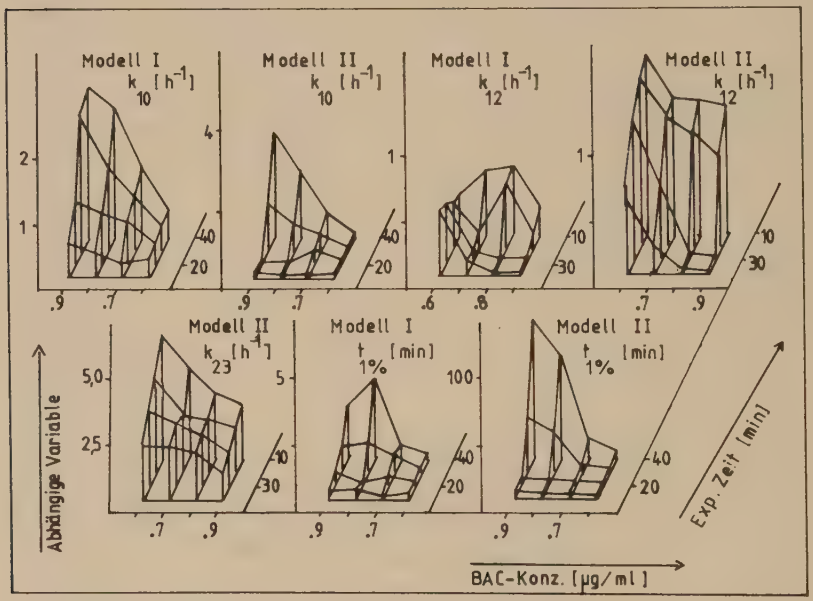


Abb 4-13 Veränderung der Modellparameter in Abhängigkeit von Expositionszeit und BAC-Konzentration bei 37.5°C

Tab. 4-1 Geschwindigkeitskonstanten der Regeneration von S.aureus nach Einwirkung von BAC bei verschiedenen Temperaturen. Durch Kurvenanpassung der Modelle I - III berechnet.

Temp	Konz	Exp.Z	k_{10}			k_{12}		k_{23}	k_{33}		
[°C]	[µg/ml]	[Min]	[h^{-1}] Modell			[h^{-1}] Modell		[h^{-1}] Modell	[h^{-1}] Modell		
			I	II	III	I	II	II	I	II	III
35.0	0.900	10	0.35	0.20	0.00	0.53	1.73	2.04	1.98	1.94	1.86
		20	0.39	0.31	0.00	0.29	0.78	1.78	2.18	2.13	1.83
		30	0.53	1.21	8.13	0.06	0.07	1.33	2.10	2.09	1.90
		40	0.98	2.25	7.19	0.07	0.03	1.01	1.90	2.06	1.92
37.5	0.600	10	0.23	0.12	0.00	0.30	1.36	4.72	2.55	2.48	2.43
		20	0.25	0.19	0.00	0.35	1.28	3.49	2.78	2.51	2.30
		30	0.35	0.16	0.00	0.46	1.06	2.78	2.72	2.32	2.63
		40	0.34	0.17	0.00	0.38	0.56	2.05	2.74	2.41	2.56
37.5	0.700	10	0.21	0.005	0.00	0.49	1.02	3.34	2.15	2.39	2.01
		20	0.62	0.58	0.00	0.15	0.99	2.03	2.37	2.36	1.97
		30	0.70	0.66	0.00	0.09	0.56	2.36	2.62	2.41	2.33
		40	0.92	0.87	6.51	0.12	0.21	1.96	2.44	2.44	2.35
37.5	0.800	10	0.20	0.01	0.00	0.44	1.05	2.49	2.39	2.38	2.29
		20	0.68	0.02	0.00	0.82	0.97	2.03	2.23	2.23	2.33
		30	1.03	1.01	6.27	0.05	0.10	1.97	2.22	2.22	2.12
		40	1.65	0.89	4.46	0.02	0.04	1.79	2.59	2.58	2.40
37.5	0.800	10	0.10	0.01	0.00	0.54	0.99	2.65	2.42	2.45	2.33
		20	0.58	0.03	0.00	0.52	0.87	2.26	2.31	2.32	2.16
		30	0.68	0.07	4.37	0.03	0.05	2.26	2.24	2.23	2.45
		40	1.45	2.58	6.12	0.01	0.03	1.99	2.92	2.54	2.39
37.5	0.900	10	0.44	0.40	0.00	0.20	0.91	2.01	2.47	2.43	2.01
		20	0.77	0.61	0.00	0.10	0.68	1.68	2.40	2.43	2.14
		30	1.76	1.70	6.94	0.06	0.08	1.27	2.10	2.30	2.05
		40	1.88	3.94	6.42	0.03	0.03	0.99	2.14	2.55	2.23
40.0	0.900	10	0.08	0.02	0.00	0.13	1.45	2.51	2.93	2.89	2.57
		20	0.09	0.05	0.00	0.05	0.83	1.83	3.10	2.85	2.56
		30	0.44	0.91	4.21	0.02	0.68	1.45	2.65	2.65	2.45
		40	1.18	2.34	6.12	0.03	0.13	1.18	2.44	2.60	2.39

Tab. 4-2 Modellkonstanten der Regeneration von S.aureus nach Einwirkung von BAC bei verschiedenen Temperaturen. Durch Kurvenanpassung der Modelle I - III berechnet.

Temp	Konz	Exp.Z	$t_{1\%}$		t_{lag}	Überlebende Keime			
[°C]	[µg/ml]	[Min]	[Min] Modell		[Min] Modell	[%] Modell			
			I	II	III	I	II	III	CC
35.0	0.900	10	1	2	49	62	87	100	43
		20	2	4	53	43	72	100	35
		30	10	44	95	10	5	78	11
		40	9	102	102	7	4	58	9
37.5	0.600	10	2	2	53	36	92	100	
		20	2	2	57	38	87	100	
		30	1	2	50	57	87	100	
		40	2	5	48	71	77	100	
37.5	0.700	10	1	3	50	100	100	100	28
		20	4	3	65	20	63	100	17
		30	7	5	74	5	45	100	10
		40	5	15	72	9	19	75	6
37.5	0.800	10	1	3	50	99	99	100	32
		20	1	3	50	100	33	100	25
		30	12	31	112	10	9	67	5
		40	30	77	113	2	4	29	1
37.5	0.800	10	1	3	53	69	99	100	31
		20	1	4	49	55	97	100	25
		30	20	61	91	4	7	80	5
		40	60	103	99	2	3	44	1
37.5	0.900	10	3	3	60	31	70	100	19
		20	6	5	77	15	51	100	11
		30	10	38	96	7	4	68	3
		40	20	102	109	2	3	31	1
40.0	0.900	10	5	2	61	62	98	100	21
		20	12	4	76	36	94	100	13
		30	30	5	99	3	43	80	5
		40	20	24	105	2	5	44	4

4.5.2. Chlorhexidingluconat

Statistische Beurteilung der Anpassungsgüte

Der Verlauf der Regeneration von S.aureus nach Schädigung mit CHG unterschied sich deutlich von der Regeneration nach Einwirkung von BAC. In keinem Fall verringerte sich die Keimzahl in der Anfangsphase und das logarithmische Wachstum begann verzögert. Das erste Modell ergab eine gute Übereinstimmung mit den Meßdaten. Die extrem niedrigen Übergangsraten k_{12} besonders nach langer Expositionszeit ließen aber Zweifel an der Zweckmäßigkeit des Modells aufkommen (s.Tab.4-3). Auch die Geschwindigkeitskonstanten der logarithmischen Wachstumsphase gaben Anlaß zu Bedenken, weil sie besonders bei langer Expositionszeit teilweise scheinbar doppelt so groß waren, wie die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten von S.aureus bei den entsprechenden Temperaturen ohne Konservierungsmitteleinfluss. Dabei handelt es sich möglicherweise um einen experimentellen Artefakt, der auftritt, wenn während der logarithmische Wachstumsphase relativ wenig Keimzahlbestimmungen durchgeführt werden.
Beim Übergang zum Modell II wurde die Anpassung nicht verbessert, aber die Werte der Übergangsraten lagen in sinnvolleren Bereichen. Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten wurden immer noch überschätzt, wenn auch nicht mehr so stark wie bei Modell I.
Im Gegensatz zu den Kulturen, die mit BAC behandelt wurden, konnte die Regeneration nach CHG-Schädigung mit dem Modell III relativ gut beschrieben werden, obwohl die Anpassung im Anfangsbereich nicht voll befriedigte (s.Abb. 4-14). Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten stimmten jedoch mit den Vergleichswerten gut überein.

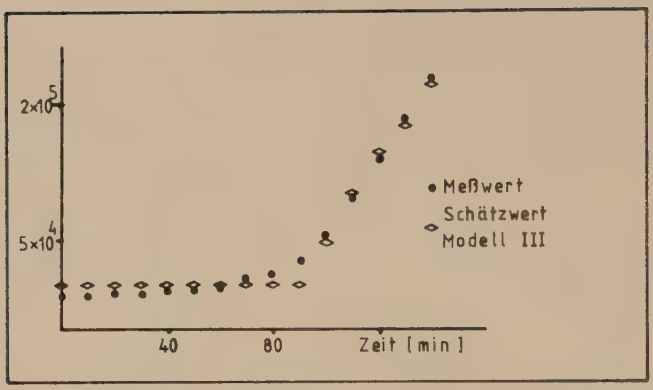


Abb. 4-14 Kurvenanpassung im Modell III für die Regeneration von S.aureus nach 30 Minuten Schädigung mit 1.125 µg/ml CHG bei 40°C

Abhängigkeit der Versuchsparameter von den Versuchsvariablen

Auch bei der Betrachtung der Zusammenhänge zwischen Expositionszeit und Absterbegeschwindigkeitskonstante k_{10} zeigten sich die Schwächen des Modells I. Eine allgemeine Tendenz war nicht erkennbar (s. Tab. 4-3). Die Übergangsgeschwindigkeitskonstanten k_{12} wurden dagegen mit zunehmender Exposition deutlich kleiner. Sie nahmen aber zum Teil so niedrige Werte an, daß sie außerhalb des Bereiches lagen, der sinnvoll erscheint.

Im Modell II hingegen ließ die Veränderung der Modellkonstanten mit zunehmender Expositionszeit in jedem Fall eine Richtung erkennen, die auch theoretisch zu rechtfertigen ist, ohne daß die Werte außerhalb einer akzeptablen Größenordnung lagen. Die Absterbegeschwindigkeitskonstanten wurden mit zunehmender Schädigungsdauer größer und die Übergangsraten k_{12} und k_{23} kleiner. Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten lagen eng beieinander, waren aber immer noch größer als die der Referenzversuche.

Die Wachstumsgeschwindigkeitskonstanten im Modell III entsprachen diesen jedoch weitgehend und die Dauer der 'lag-Zeit' wuchs mit zunehmender Expositionszeit. Dieses Modell hat jedoch zwei syste-

matische Schwächen : ein leichter Anstieg der Keimzahl vor Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wird nicht erfaßt und die Annahme, daß alle Keime nach Beendigung der Ruhephase sich schlagartig wieder vermehren, trifft nicht zu (s. Abb. 4-14). An den Übergangsbögen erkennt man, daß die Keime nacheinander mit dem Wachstum beginnen.

Tab. 4-3 Geschwindigkeitskonstanten der Regeneration von S.aureus nach Einwirkung von CHG bei verschiedenen Temperaturen. Durch Kurvenanpassung der Modelle I - III berechnet.

Temp [°C]	Konz [µg/ml]	Exp.Z [Min]	k_{10} [h^{-1}] Modell I	k_{10} [h^{-1}] Modell II	k_{10} [h^{-1}] Modell III	k_{12} [h^{-1}] Modell I	k_{12} [h^{-1}] Modell II	k_{23} [h^{-1}] Modell II	k_{33} [h^{-1}] Modell I	k_{33} [h^{-1}] Modell II	k_{33} [h^{-1}] Modell III
35.0	1.000	10	0.07	0.04	0.00	0.08	0.47	1.91	2.36	2.15	1.61
		20	0.02	0.01	0.00	0.04	0.39	1.99	2.59	2.19	1.50
		30	0.17	0.15	0.00	0.04	0.19	1.78	2.51	2.07	1.84
		40	0.06	0.56	0.00	0.005	0.08	1.36	3.20	2.18	1.73
37.5	1.000	10	0.11	0.06	0.00	0.08	0.47	1.77	2.66	2.59	2.03
		20	0.10	0.06	0.00	0.03	0.21	1.77	3.00	2.45	2.13
		30	0.21	0.19	0.00	0.03	0.14	1.59	2.67	2.33	2.04
		40	0.01	0.25	0.00	0.001	0.03	1.18	4.22	2.49	2.05
40.0	1.125	10	0.15	0.08	0.00	0.13	0.63	1.96	2.76	2.71	2.34
		20	0.20	0.03	0.00	0.06	0.39	1.93	2.98	2.93	2.44
		30	0.07	0.05	0.00	0.02	0.25	1.79	3.16	2.63	2.43
		40	0.03	0.17	0.00	0.003	0.04	1.56	4.47	2.71	2.31

Tab. 4-4 Modellkonstanten der Regeneration von S.aureus nach nach Einwirkung von CHG bei verschiedenen Temperaturen. Durch Kurvenanpassung der Modelle I - III berechnet.

Temp [°C]	Konz [µg/ml]	Exp.Z [Min]	$t_{1\%}$ [Min.] Modell I	II	t_{lag} [Min.] Modell III	Überlebende Keime [%] Modell I	II	III	CC
35.0	1.000	10	8	7	70	53	92	100	20
		20	15	8	73	66	89	100	36
		30	15	16	85	19	55	100	22
		40	120	38	99	8	13	100	13
37.5	1.000	10	8	7	69	42	89	100	18
		20	20	15	79	23	72	100	17
		30	20	22	90	13	42	100	11
		40	667	103	114	1	18	100	7
40.0	1.125	10	5	5	62	46	89	100	12
		20	10	8	73	23	93	100	10
		30	30	12	88	22	83	100	6
		40	200	77	109	1	11	100	2

4.6. Vergleich der Wirkungsintensität von BAC und CHG

Die vom DAC empfohlenen Konzentrationen für BAC und CHG sind mit 0.01 % gleich. Umgerechnet auf eine molare Basis ist die Konzentration von BAC aber mehr als doppelt so groß (vgl.Tab. 4-5/6). Dabei muß beachtet werden, daß BAC eine Mischung von Homologen mit verschieden langen Alkylresten darstellt.

Vergleicht man die beiden Konservierungsmittel auf dieser Basis, so zeigt sich, daß für die gleiche Wirkung eine höhere BAC-Konzentration notwendig ist. Das verdeutlicht die Abb. 4-15, in der der Anteil der Keime, die innerhalb der ersten 60 Sekunden nach Konservierungsmittelzugabe absterben, gegen die molekulare Konzentration aufgetragen wurde. Bei deutlich niedrigerer molekularer Konzentration liegen nicht nur die Abtötung in den ersten 60 Sekunden sondern auch die Absterbegeschwindigkeitskonstanten für CHG über den Werten von BAC (s. Tab.4-5/6). Es ist auffallend, daß die Wachstumsverzögerungen nach Schädigung durch Konzentrationen, die den gleichen Effekt hervorrufen, d.h. äquipotent sind, vergleichbar sind (s. Tab. 4-5/6, Abb. 4-16).

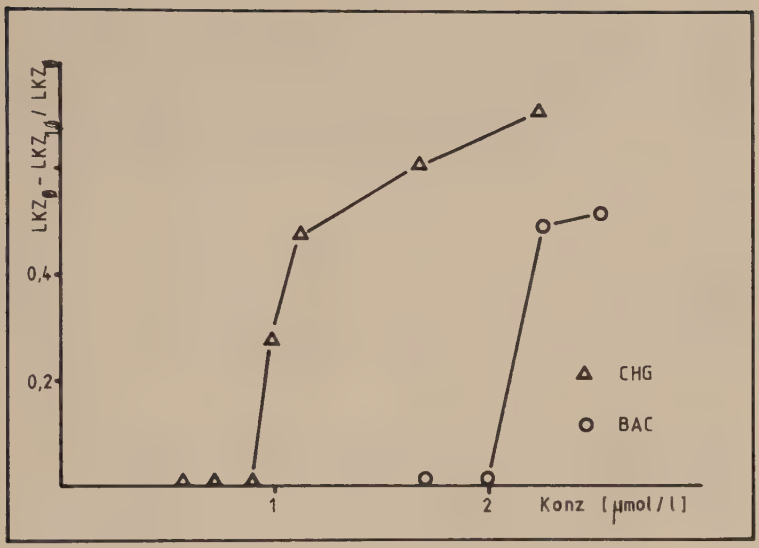


Abb. 4-15 Anteil der Keime, die in den ersten 60 Sekunden nach Einwirkung von CHG oder BAC bei 37.5°C absterben

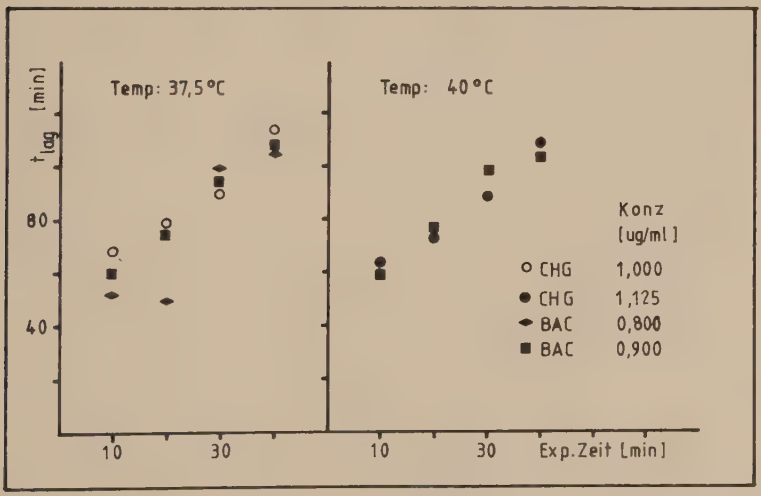


Abb. 4-16 Verzögerungszeiten bis zum Beginn des logarithmischen Wachstum bei äquipotenten BAC- und CHG-Konzentrationen

Tab. 4-5 Konstanten der Abtötung in Abhängigkeit von molaren BAC-Konzentrationen und Temperatur

Konz	Konz	Anteil abgetöteter Keime in den ersten 60 Sekunden der KM-Einwirkung			Absterbegeschwindigkeits-konstante		
[µg/ml]	[µmol/l]				[h^{-1}]		
		35.0°C	37.5°C	40.0°C	35.0°C	37.5°C	40.0°C
0.600	1.695		0			0.70	
0.700	1.977	0	0	0	1.59	2.14	2.45
0.800	2.260	0.07	0.50	0.52	3.10	3.64	3.56
0.900	2.542	0.50	0.52	0.49	4.51	5.08	4.81

Tab. 4-6 Konstanten der Abtötung in Abhängigkeit von molaren CHG-Konzentrationen und Temperatur

Konz	Konz	Anteil abgetöteter Keime in den ersten 60 Sekunden der KM-Einwirkung			Absterbegeschwindigkeits-konstante		
[µg/ml]	[µmol/l]				[h^{-1}]		
		35.0°C	37.5°C	40.0°C	35.0°C	37.5°C	40.0°C
0.500	0.557		0			0.94	
0.625	0.697	0.03	0		0.99	1.76	
0.750	0.836	0.03	0.03	0.01	1.75	2.65	1.53
0.875	0.976	0	0.28	0	2.39	3.55	2.28
1.000	1.115	0.51	0.48	0.03	3.32	4.11	3.25
1.125	1.254			0.47			4.15
1.500	1.672		0.61			5.49	
2.000	2.229		0.71			6.24	

4.7. Verzögerungszeiten

Eine einfache Umformung der Wachstumsexponentialfunktion, die der Auswertung der Coulter Counter Daten zugrunde gelegt wurde (siehe Gl. 4-38) :

$$LKZ_{i,j} = LKZ^*_{i,0}\, e^{k_i\, t} \qquad \text{Gl. 4-38}$$

ermöglicht die Berechnung der Verzögerungszeiten, die mit dem Coulter Counter nicht erfaßt wurden. Setzt man für die betreffende Meßreihe den extrapolierten Wert der Lebendkeimzahl zum Zeitpunkt des Überimpfens $LKZ^*_{i,0}$ und die entsprechende Wachstumsgeschwindigkeitskonstante in die Exponentialgleichung ein, so entspricht der Zeitpunkt, zu dem die berechnete Lebendkeimzahl den nach der Plattenmethode beobachteten Wert $LKZ_{i,0}$ annimmt, der Verzögerungszeit. Demnach gilt für die logarithmierte Form :

$$\ln LKZ_{i,0} = \ln LKZ^*_{i,0} + k_i\, t_{lag} \qquad \text{Gl. 4-39}$$

Durch Umformen ergibt sich die Verzögerungszeit zu :

$$t_{lag} = \frac{\ln \dfrac{LKZ_{i,0}}{LKZ^*_{i,0}}}{k_i} \qquad \text{Gl. 4-40}$$

Vergleicht man die so berechneten Verzögerungszeiten (s. Tab. 4-7/8) graphisch mit entsprechenden, die für die Regenerationsversuche nach der Plattenmethode gemäß Modell III erhalten wurden, wird der enge Zusammenhang der beiden Meßmethoden ersichtlich. Nach der Behandlung mit CHG verändert sich die Keimzahl während der Anfangsphase der Regeneration praktisch nicht, so daß man von einer Verzögerungszeit sprechen kann. Die Punkte streuen nur wenig (Regressionskoeffizient r = 0.948) um eine Gerade mit dem Ordinatenabschnitt (b = 14.96 min) und einer Steigung von m = 0.82 . Die Annahme, daß das Verzögerungsmodell den Verlauf der Regeneration nach BAC-Schädigung beschreibt, kann nur als grobe Annäherung

betrachtet werden, weil die Lebendkeimzahl nach dem Überimpfen noch deutlich vermindert wird. Der Zusammenhang zwischen den beiden Datensätzen besteht (r = 0.970) und die Punkte streuen wenig, der Ordinatenabschnitt ist aber mit b = 25.03 min größer als bei CHG und die Steigung mit m = 0.62 kleiner.

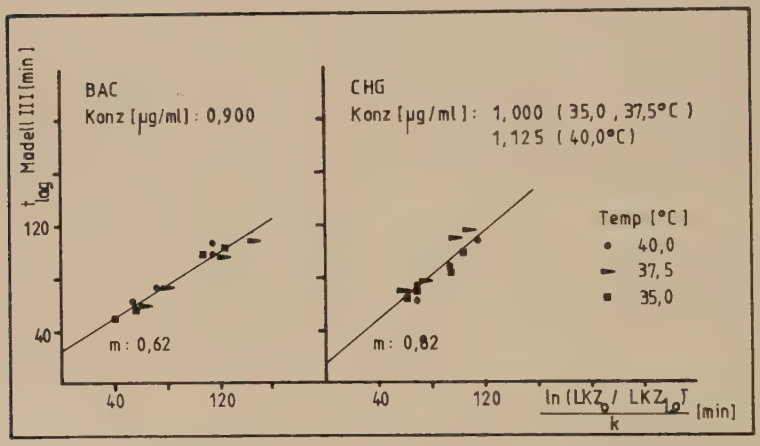


Abb. 4-17 Zusammenhang der Verzögerungszeiten, die nach der Platten- und der Coulter Counter Methode ermittelt wurden

Tab. 4-7 Verzögerungszeiten der Regeneration, die nach BAC-Schädigung in Nortons Inaktivierungsbouillon nach der Coulter Counter Technik gefunden wurden

	Temperatur								
	35.0°C			37.5°C			40.0°C		
	Konzentration [µg/ml]								
Exp.Z. [min]	0.700	0.800	0.900	0.700	0.800	0.900	0.700	0.800	0.900
10	41	43	40	41	41	62	44	41	56
20	47	46	57	55	54	80	56	51	71
30	48	80	106	66	102	124	61	89	115
40	57	102	122	82	125	145	69	106	114

Tab. 4-8 Verzögerungszeiten der Regeneration, die nach CHG-Schädigung in Nortons Inaktivierungsbouillon nach der Coulter Counter Technik gefunden wurden

Exp.Z. [min]	Temperatur 35.0°C Konzentration [µg/ml]				Temperatur 37.5°C Konzentration [µg/ml]					Temperatur 40°C Konzentration [µg/ml]			
	.625	.750	.875	1.000	.500	.625	.750	.875	1.000	.750	.875	1.000	1.125
10	45	52	61	65	47	50	61	66	62	45	56	61	70
20	48	52	65	68	46	51	65	73	75	45	61	67	69
30	50	62	81	90	50	59	81	85	90	51	73	86	92
40	50	64	82	109	50	65	87	102	108	55	82	91	115

5. DISKUSSION

Neben der ursprünglichen Fragestellung nach der Abhängigkeit der Absterbekinetik von S.aureus von Konservierungsmittelkonzentration und Temperatur trat im Verlauf der Untersuchung die Kinetik der Regeneration nach Beendigung der Schädigung stärker in den Vordergrund. Die Versuche zur Aufklärung des Verlaufes der Regeneration dienten zunächst dazu, die Abweichungen zwischen den nach der Plattenmethode beobachteten und nach der Coulter Counter Technik extrapolierten Lebendkeimzahlen unmittelbar nach dem Überimpfen aufzuklären. Dabei zeigte sich, daß die Coulter Counter Daten nicht einfach zu intepretieren sind, weil die Mikroorganismen verzögert anwachsen.

Das Erscheinungsbild der Anfangsphase der Regeneration war im wesentlichen vom Konservierungsmittel abhängig. Die charakteristischen Eigenschaften traten bei ansteigender Konzentration und zunehmender Expositionszeit deutlicher hervor. Innerhalb des engen Bereiches, der untersucht wurde, war der Einfluß der Temperatur weniger ausgeprägt.

Das auffallendste Merkmal der Unterschiede lag darin, daß ein Teil der Keime nach Beendigung der Schädigung durch BAC in der Inaktivierungsbouillon noch abstarb, während nach Einwirkung von CHG die Zahl der Keime vor Beginn des logarthmischen Wachstums weitgehend konstant blieb. Aus diesen Abweichungen könnte man schließen, daß die Konservierungsmittel unterschiedlich fest an die Keime gebunden werden oder an verschiedenen Orten angreifen. Die Konservierungsmittel werden in Nortons Bouillon durch Tween 80, Lecithin und Natriumthioglykolat inaktiviert. Diese Bestandteile sind erforderlich, um das Konservierungsmittel rasch unwirksam zu machen. Bei längerem Kontakt können sie aber möglicherweise auch das Wachstum der Keime beeinträchtigen. Dafür spricht, daß mehr Keime überleben, wenn Inaktivierungsbouillon statt N1-Medium für die Regenerationskultur verwendet wird, bei längerem Verbleiben der Keime in Nortons Bouillon aber noch bis zu 50 % der zunächst

überlebenden Organismen absterben. Der Einfluß auf die Keimreduktion könnte in einem Zusammenspiel zwischen Tween 80, Lecithin und dem Konservierungsmittel bei langer Einwirkungszeit liegen. In diesem Zusammenhang sind möglicherweise Beobachtungen von Brown und Richards (73) sowie Richards und Cavill (49) von Bedeutung. Sie fanden, daß geringe Mengen (0.01%) Tween 80 die Wirkung von BAC auf P.aeruginosa verstärken.

5.1. Kinetische Modelle

Qualitative Unterschiede des Absterbens bzw. der Regeneration, die auf das Konservierungsmittel zurückzuführen sind, erkennt man beim Betrachten der Daten. Zur quantitativen Auswertung ist aber ein Vergleich von Zahlenwerten notwendig. Für die numerische Interpretation, die auch den Schluß auf Elementarvorgänge umfaßt, benötigt man kinetische Modelle, deren Parameter geschätzt werden und die miteinander vergleichbar sind. Diese Interpretation ist in der Regel nicht eindeutig. Häufig sind mehrere Modelle gleich gut geeignet, die Abläufe zu beschreiben.
So entspricht das Modell III, bei dem man davon ausgeht, daß die Keime nach Beendigung der Verzögerungsphase annähernd gleichzeitig mit der Teilung beginnen, am ehesten den gängigen Vorstellungen von der Regenerationsphase. Das Modell ist eher zur Beschreibung als zur Interpretation geeignet. Auch ist die Annahme, daß alle Keime zur gleichen Zeit in die Wachstumsphase übergehen nicht sehr wahrscheinlich. Leichter interpretierbar sind dagegen Kompartimentmodelle mit stetigen Übergängen wie bei den Modellen I und II.
Stirbt zu Beginn der Regeneration ein erheblicher Anteil der Keime ab, so ist das Modell II erforderlich, um die Daten hinreichend genau zu beschreiben. Fehlen diese ausgeprägten Charakteristika, so können einige Parameter nicht sicher genug geschätzt werden, und das Modell I ist besser geeignet.
Von einem Modell wird nicht nur erwartet, daß die Kurvenverläufe hinreichend genau beschrieben werden, sondern auch, daß die Para-

meterwerte in sinnvollen Größenordnungen liegen und in einem plausiblen Zusammenhang zu den Versuchsvariablen stehen. Ein Beispiel für unrealistische Parameterwerte zeigen die Übergangsraten des Modells I nach intensiver CHG-Schädigung an. Eine akzeptable Änderung dagegen zeigen die Übergangsgeschwindigkeitskonstanten aus dem undifferenzierten Zustand in die Erholungsphase. Diese werden mit steigender Konzentration und zunehmender Schädigung kleiner.

5.2. Absterbekinetik

Im Verlauf der Abtötung kann man eine rasche Anfangsphase, die unter den gegebenen experimentellen Möglichkeiten nicht näher untersucht werden konnte, und anschließend eine exponentielle Abnahme der Lebendkeimzahl beobachten. Die Initialphase war nur bei Konzentrationen von mehr als 0.8 µg/ml BAC erkennbar. Bei CHG hing die niedrigste Konzentration, bei der die Anfangsphase auftrat, von der Temperatur ab. Dabei ergab sich ein ähnlicher Zusammenhang wie bei der Temperaturabhängigkeit der Absterbegeschwindigkeitskonstanten (s. Abb. 3-31). CHG war bei 40°C weniger wirksam als bei den beiden benachbarten Temperaturen. Eine Ursache für den auffälligen Befund, der aber reproduzierbar war, ist nicht erkennbar.
Die zweiphasige Absterbekinetik deutet darauf hin, daß auch in einer homogen erscheinenden Kultur Organismen unterschiedlicher Empfindlichkeit enthalten sind. Das könnte möglicherweise bedeuten, daß sich die Resistenz der Mikroorganismen gegenüber den Konservierungsmitteln im Laufe des Lebenszyklus ändert und zum Beispiel von Alter, Zustand oder Größe der Zelle abhängt. Aus den vorliegenden Daten ist nicht erkennbar, wie eine derartige Abhängigkeit aussehen könnte. Mit Hilfe einer sich synchron teilenden Kultur wäre es möglich, diese chronobiologische Frage zu klären.
Der Schwellenwert der Konzentration, bei dem das exponentielle Absterben beobachtet wurde, liegt bei 50 - 70 Prozent des Wertes für die rasche Initialphase. Auf molekularer Basis war CHG das wirksamere Konservierungsmittel. Dabei verlief aber die Dosis-Wirkungsbeziehung für BAC steiler.

Die Ergebnisse gelten zunächst nur für den verwendeten Stamm und die beschriebenen Versuchsbedingungen. Bei Einsatz anderer Medien ist zu erwarten, daß sich sowohl die Empfindlichkeit der Keime gegenüber den Konservierungsmitteln als auch der Verlauf der Regeneration verändert. Dabei ist die Art der Auswirkungen aufgrund der vorliegenden Daten nicht vorauszusagen.

Der Bereich der eingesetzten Wirkstoffkonzentration könnte noch erweitert werden. Vermutlich ist es noch möglich, Konzentrationen einzusetzen, die eine Abtötung von 90 Prozent der Keime in der Initialphase bewirken. Unter diesen Bedingungen wäre auch eine deutlich höhere Absterbegeschwindigkeitskonstante zu erwarten, so daß eine Probenziehung in kürzeren Zeitabständen notwendig wäre.

Ein Zusammenhang zwischen Konzentration und dem Anteil der Keime, der in der Initialphase abstirbt, ist besonders für BAC noch nicht voll befriedigend beantwortet und würde eine nähere Untersuchung rechtfertigen.

Es wäre möglicherweise interessant, die Kinetik der Abtötung und der Regeneration unter dem Einfluß eines anderen Konservierungsmittels auf der Basis von molekularen Konzentrationen oder mit anderen Keimen zu untersuchen. Bei Verwendung thermoresistenter Sporen könnte auch der Temperaturbereich deutlich ausgeweitet werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Absterbe- und Regenerationskinetik von S.aureus unter und nach dem Einfluß von Konservierungsmitteln untersucht. In Anlehnung an eine Arbeitsmethode von Seydel und Wempe (34) wurde parallel mit dem Coulter Counter und der Plattengußmethode der Verlauf der Abtötung verfolgt, während die Anfangsphase der Regeneration nur nach der Plattenmethode beobachtet werden konnte.

Die Absterbekinetik ist für die pharmazeutische Technologie und die Mikrobiologie von praktischem Interesse bei der Konservierung von Arzneimitteln, während über den Verlauf der Regeneration auf die die Wirkungsweise verschiedener Konservierungsmittel rückgeschlossen werden kann.

Die zweistufige Absterbekinetik konnte nur deskriptiv behandelt werden weil die rasche Initialphase nicht näher untersucht werden konnte. Die beobachtete Absterbegeschwindigkeitskonstante stieg im untersuchten Konzentrationsintervall für BAC nahezu linear an. Für CHG wurden auch wesentlich höhere Konzentrationen untersucht, bei denen die Zunahme unterproportional war. In dem engen Temperaturintervall in dem die Untersuchung möglich war, stieg die Wirkung von BAC an, während sie für CHG bei 40°C ein reproduzierbares Minimum zeigte.

Zur quantitativen Auswertung der Regenerationsverläufe wurden verschiedene mathematische Modelle herangezogen, die zum Teil biologisch interpretiert werden können. So gehen die Keime in Modell I aus dem wenig differenzierten Zustand, in dem sie sich unmittelbar nach dem Überimpfen befinden, entweder in die Wachstumsphase über oder sie sterben auch in der Inaktivierungsbouillon ab. Das erweiterte Modell II erfaßt stark geschädigte Keime. Nach dem Verlassen des Eingangskompartimentes treten die Keime in eine Reparaturphase ein, in der keine Vermehrung stattfindet. Im Anschluß daran beginnt die neue Wachstumsphase. Als Alternative zu den Kompartimentmodellen

wurde noch das mathematische Modell III entwickelt. Dieses berücksichtigt die gängigen Vorstellungen von den Verzögerungszeiten, die nach Inaktivierung der Konservierungsmittel beobachtet wurden. Sobald die vom Konservierungsmittel verursachten Schäden weitgehend behoben sind, beginnt wieder das logarithmische Wachstum. Die ausgeprägte Verzögerungsphase macht die Extrapolation der Coulter Counter-Meßdaten problematisch, da die zurückgerechnete Lebendkeimzahl zum Zeitpunkt des Überimpfens nicht mit den Befunden der Plattenmethode übereinstimmt. Die rückextrapolierte Ausgangskeimzahl ist deutlich niedriger als die direkt bestimmte und liegt in der Regel auch unter dem Anteil überlebender Keime, der mit Hilfe der Modelle I und II berechnet wurde.

Die quantitative Auswertung zeigt, daß der Verlauf der Abtötung vor allem aber die Regeneration bei Behandlung mit BAC sichtlich anders ist als unter dem Einfluß von CHG. Umgerechnet auf eine molekulare Basis erwies sich CHG als wirksamer. Seine Konzentrations-Wirkungskurve verläuft allerdings flacher. Nach der Einwirkung von BAC ist eine erhebliche Abnahme der Lebendkeimzahl nach dem Überimpfen festzustellen. Das war bei CHG nicht zu beobachten.

Der Verlauf der Regeneration läßt sich zwar nicht eindeutig interpretieren, legt aber den Schluß nahe, daß entweder der Angriffsort der Konservierungsmittel oder der Mechanismus ihrer Inaktivierung oder beide Faktoren unterschiedlich sind.

Anhang A : Laplace-Transformation der Gleichungen 4-21 bis 4-23

Die Transformation der Gleichung 4-21 ergibt :

$$L\left\{-\frac{dE}{dt}\right\} : \quad s\ e(s) - E_0 = -(k_{10} + k_{12})\ e(s) \qquad \text{Gl. A-1}$$

Durch Umformen gilt für e(s) :

$$e(s) = \frac{E_0}{(s + k_{10} + k_{12})} \qquad \text{Gl. A-2}$$

Durch Rücktransformation erhält man die Zahl der Organismen, die sich im Kompartiment E befinden :

$$E = E_0\ e^{-(k_{10} + k_{12})\ t} \qquad \text{Gl. A-3}$$

Die Transformation von 4-22 führt zu :

$$L\left\{\frac{dR}{dt}\right\} : \quad s\ r(s) - R_0 = k_{12}\ e(s) - k_{23}\ r(s) \qquad \text{Gl. A-4}$$

In die Gleichung A-4 kann e(s) aus Gl. A-2 eingesetzt werden. R_0 ist zu Beginn der Regeneration gleich Null :

$$s\ r(s) = \frac{k_{12}\ E_0}{(s + k_{10} + k_{12})} - k_{23}\ r(s) \qquad \text{Gl. A-5}$$

Aus der Umformung analog den bisherigen Beispielen folgt r(s) :

$$r(s) = \frac{k_{12}\ E_0}{(s + k_{10} + k_{12})\ (s + k_{23})} \qquad \text{Gl. A-6}$$

Die Partialbruchzerlegung führt zu :

$$\frac{k_{12}\quad E_0}{(s + k_{10} + k_{12})\quad (s + k_{23})} = \frac{A}{(s + k_{10} + k_{12})} + \frac{B}{(s + k_{23})} \qquad \text{Gl. A-7}$$

Wie bei den Gleichungen 4-17 und 4-18 beschrieben, können A und B berechnet werden zu :

$$A = \frac{k_{12}\quad E_0}{(k_{23} - k_{10} - k_{12})} \qquad \text{Gl. A-8}$$

$$B = \frac{k_{12}\quad E_0}{(k_{10} + k_{12} - k_{23})} \qquad \text{Gl. A-9}$$

Durch Einsetzen von A-8 und A-9 in A-7 ergibt sich :

$$r(s) = \frac{k_{12}\quad E_0}{(k_{23}-k_{10}-k_{12})\ (s+k_{10}+k_{12})} + \frac{k_{12}\quad E_0}{(k_{10}+k_{12}-k_{23})\ (s+k_{23})} \qquad \text{Gl. A-10}$$

Durch Rücktransformation von A-10 erhält man für R :

$$R = \frac{k_{12}\quad E_0}{(k_{23}-k_{10}-k_{12})}\ e^{-(k_{10}+k_{12})\ t} + \frac{k_{12}\quad E_0}{(k_{10}+k_{12}-k_{23})}\ e^{-k_{23}\ t} \qquad \text{Gl. A-11}$$

Transformation von Gleichung 4-23 ergibt :

$$L\left\{\frac{dW}{dt}\right\} : \quad s\ w(s) - W_0 = k_{23}\ r(s) + k_{33}\ w(s) \qquad \text{Gl. A-12}$$

In A-12 kann r(s) aus A-6 eingesetzt werden. Subtrahiert man (k_{33} w(s)), klammert w(s) aus und teilt durch ($s-k_{33}$), so gilt mit W_0 gleich Null :

$$w(s) = \frac{k_{23}\quad k_{12}\quad E_0}{(s + k_{10} + k_{12})\quad (s + k_{23})\quad (s - k_{33})} \qquad \text{Gl. A-13}$$

Aus der Partialbruchzerlegung folgt :

$$\frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(s+k_{10}+k_{12})(s+k_{23})(s-k_{33})} = \frac{A}{(s+k_{10}+k_{12})} + \frac{B}{(s+k_{23})} + \frac{C}{(s-k_{33})} \qquad \text{Gl. A-14}$$

Durch Umformen erhält man :

$$A = \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{23} - k_{10} - k_{12})\ (-k_{10} - k_{12} - k_{23})} \qquad \text{Gl. A-15}$$

$$B = \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{10} + k_{12} - k_{23})\ (-k_{23} + k_{33})} \qquad \text{Gl. A-16}$$

$$C = \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{10} + k_{12} + k_{33})\ (k_{23} + k_{33})} \qquad \text{Gl. A-17}$$

Werden A-15 bis A-17 in A-14 eingesetzt, folgt für w(s) :

$$w(s) = \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{23} - k_{10} - k_{12})\ (-k_{10} - k_{12} - k_{33})\ (s + k_{10} + k_{12})}$$

$$+ \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{10} + k_{12} - k_{23})\ (-k_{23} - k_{33})\ (s + k_{23})}$$

$$+ \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{10} + k_{12} + k_{33})\ (k_{23} + k_{33})\ (s - k_{33})} \qquad \text{Gl. A-18}$$

Aus der Rücktransformation von A-18 ergibt sich W zu :

$$W = \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{23} - k_{10} - k_{12})\ (-k_{10} - k_{12} - k_{33})}\ e^{-(k_{10} + k_{12})\ t}$$

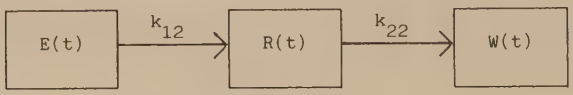
$$+ \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{10} + k_{12} - k_{23})\ (-k_{23} - k_{33})}\ e^{-k_{23}\ t}$$

$$+ \frac{k_{23}\ k_{12}\ E_0}{(k_{10} + k_{12} + k_{33})\ (k_{23} + k_{33})} \times e^{k_{33}\ t} \qquad \text{Gl. A-19}$$

Für jeden beliebigen Zeitpunkt kann die Lebendkeimzahl aus der Summe der Gleichungen A-3, A-11 und A-19 gebildet werden.

Anhang B : Ableitung der Gleichung zur Berechnung von $t_{1\%}$

Der Übergang der Keime in das 3. Kompartiment kann wie folgt beschrieben werden :



Die entsprechenden Differentialgleichungen lauten :

$$\frac{dE}{dt} = - k_{12} E \qquad \text{Gl. A-1}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_{12} E - k_{23} R \qquad \text{Gl. A-2}$$

$$\frac{dW}{dt} = k_{23} R \qquad \text{Gl. A-3}$$

Daraus folgt nach der Laplace Transformation folgendes Gleichungssystem :

$$L\left\{\frac{dE}{dt}\right\} : \quad s\ e(s) - E_0 = - k_{12}\ e(s) \qquad \text{Gl. A-4}$$

$$e(s) = \frac{E_0}{(s + k_{12})} \qquad \text{Gl. A-5}$$

$$L^{-1}\left\{e(s)\right\} : \quad E = E_0\ e^{- k_{12} t} \qquad \text{Gl. A-6}$$

$$L\left\{\frac{dR}{dt}\right\} : \quad s\,R(s) - 0 = \frac{k_{12}\,E_0}{(s + k_{12})} - k_{23}\,r(s) \qquad \text{Gl. A-7}$$

$$r(s) = \frac{k_{12}\,E_0}{(s + k_{12})(s + k_{23})} = \frac{A}{(s + k_{12})} + \frac{B}{(s + k_{23})} \qquad \text{Gl. A-8}$$

$$A = \frac{k_{12}\,E_0}{(k_{23} - k_{12})} \qquad \text{Gl. A-9}$$

$$B = \frac{k_{12}\,E_0}{(k_{12} - k_{23})} \qquad \text{Gl. A-10}$$

$$r(s) = \frac{k_{12}\,E_0}{(k_{23} - k_{12})(s + k_{12})} + \frac{k_{12}\,E_0}{(k_{12} - k_{23})(s + k_{23})} \qquad \text{Gl. A-11}$$

$$L^{-1}\left\{r(s)\right\} : R = \frac{k_{12}\,E_0}{(k_{23} - k_{12})}\,e^{-k_{12}t} + \frac{k_{12}\,E_0}{(k_{12} - k_{23})}\,e^{-k_{23}t} \qquad \text{Gl. A-12}$$

$$L\left\{\frac{dW}{dt}\right\} : \quad s\,w(s) - 0 = \frac{k_{12}\,k_{23}\,E_0}{(s + k_{12})(s + k_{23})} \qquad \text{Gl. A-13}$$

$$w(s) = \frac{k_{12}\,k_{23}\,E_0}{s(s + k_{12})(s + k_{23})} = \frac{A}{s} + \frac{B}{(s + k_{12})} + \frac{C}{(s + k_{23})} \qquad \text{Gl. A-14}$$

$$A = \frac{k_{12}\,k_{23}\,E_0}{k_{23}\,k_{12}} = E_0 \qquad \text{Gl. A-15}$$

$$B = \frac{k_{12}\,k_{23}\,E_0}{-k_{12}\,(k_{23} - k_{12})} \qquad \text{Gl. A-16}$$

$$C = \frac{k_{12}\,k_{23}\,E_0}{-k_{23}\,(k_{12} - k_{23})} \qquad \text{Gl. A-17}$$

$$w(s) = \frac{E_0}{s} - \frac{k_{12}\ k_{23}\ E_0}{k_{12}(k_{23}-k_{12})(s+k_{12})} - \frac{k_{12}\ k_{23}\ E_0}{k_{23}(k_{12}-k_{23})(s+k_{23})} \qquad \text{Gl. A-18}$$

$$L^{-1}\left\{w(s)\right\}: W = E_0 - \frac{k_{12}\ k_{23}\ E_0}{k_{12}(k_{23}-k_{12})} e^{-k_{12}t} - \frac{k_{12}\ k_{23}\ E_0}{k_{23}(k_{12}-k_{23})} e^{-k_{23}t} \qquad \text{Gl. A-19}$$

Der Zeitpunkt, zu dem W den Wert annimmt, der 1% der überlebenden Keime beträgt, entspricht $t_{1\%}$.

Anhang C : Statistischen Daten der Kurvenanpassung für die Modelle I bis III

Statistische Kriterien zu der Kurvenanpassung der Modelle I bis III für die Regeneration nach Schädigung mit BAC

Temp [°C]	Konz [µg/ml]	Exp.Z [min]	SSQ I	SSQ II	SSQ III	Ergebnis F-Test	AIC I	AIC II	AIC III	Standardabweich. der Residuen [%] I	Standardabweich. der Residuen [%] II	Standardabweich. der Residuen [%] III
35.0	0.9	10	490	407	1502	-	85.5	82.1	100.1	5.5	6.0	7.5
		20	119	100	1319	-	65.1	63.8	98.4	4.3	4.3	4.9
		30	137	136	998000	-	86.6	86.5	241.5	5.9	6.2	11.4
		40	134	13	9904	+	86.3	47.2	161.4	11.5	3.4	11.1
37.5	0.6	10	672	612	2320	-	74.6	74.6	90.3	9.2	9.1	13.9
		20	241	217	1210	-	63.3	63.2	83.1	5.9	6.4	7.4
		30	2340	2140	10341	-	103.9	103.7	125.2	8.6	8.7	23.4
		40	1190	1020	8229	-	95.1	94.1	122.2	8.0	8.1	9.6
37.5	0.7	10	3980	2540	8780	+	110.8	105.9	123.1	10.2	8.9	20.4
		20	859	827	3215	-	90.8	91.3	110.0	7.3	8.0	10.0
		30	1330	1310	401200	-	125.3	126.0	222.1	6.7	7.1	13.2
		40	259	251	2011900	-	97.5	98.0	291.6	4.8	5.1	7.8
37.5	0.8	10	6370	3830	9557	+	151.9	144.3	161.2	7.9	3.9	26.1
		20	1880	1320	10124	+	131.2	126.2	161.8	6.7	4.5	18.4
		30	53	53	49500	-	78.4	79.3	221.2	10.5	9.9	19.8
		40	87	47	6500	+	87.9	77.2	180.6	22.1	10.6	10.8
37.5	0.8	10	3060	1890	13537	+	139.4	132.3	166.7	4.2	4.0	19.4
		20	3960	3410	8716	-	143.8	142.3	159.2	5.0	4.8	5.9
		30	463	460	21500	-	119.0	120.5	214.6	9.2	9.6	8.6
		40	567	361	4180	+	123.5	115.9	180.1	14.0	11.0	7.2
37.5	0.9	10	347	312	2687	-	85.0	84.4	115.5	5.6	5.4	12.3
		20	21	21	7989	-	45.6	46.4	130.8	2.3	2.3	8.6
		30	165	70	3630000	+	100.0	84.9	281.3	11.2	6.3	12.6
		40	207	32	8970	+	104.3	70.0	177.9	27.5	5.5	9.3
40.0	0.9	10	1140	1020	3210	-	94.5	94.1	110.0	7.5	8.0	7.3
		20	284	273	9820	-	76.4	76.9	124.5	3.5	3.7	24.5
		30	40	39	4180	-	72.9	73.8	163.4	7.6	7.7	8.8
		40	63	35	21500	+	81.6	71.2	194.5	12.8	13.2	7.3

F-Test : + Modell II signifikant besser, - Modell II nicht signifikant besser

Statistische Kriterien zu der Kurvenanpassung der Modelle I bis III für die Regeneration nach Schädigung mit CHG

Temp [°C]	Konz [µg/ml]	Exp.Z [Min]	SSQ			Ergebnis F-Test	AIC			Standardabweich. der Residuen [%]		
			I	II	III		I	II	III	I	II	III
35.0	1.000	10	607	539	1210	-	86.3	85.8	97.3	4.2	4.3	8.4
		20	380	358	1112	-	80.2	80.5	96.2	4.4	4.7	8.3
		30	529	499	480	-	97.1	97.2	97.6	6.1	6.5	3.7
		40	91	90	96	-	70.7	71.5	73.5	4.0	4.3	3.9
37.5	1.000	10	607	539	1310	-	86.3	85.8	98.3	6.1	6.3	10.5
		20	380	358	1196	-	80.2	80.5	97.1	2.8	3.0	19.3
		30	529	499	987	-	97.1	97.2	108.4	5.4	5.7	8.3
		40	91	90	869	-	70.7	71.5	106.5	2.5	2.8	7.3
40.0	1.125	10	826	743	1012	-	90.3	89.9	95.0	7.7	7.1	11.1
		20	253	237	543	-	74.9	75.1	86.9	6.6	5.9	9.0
		30	120	113	596	-	74.8	74.9	100.9	5.0	5.3	11.8
		40	78	78	76	-	68.4	69.4	70.0	7.6	7.7	4.8

F-Test : + Modell II signifikant besser, - Modell II nicht signifkant besser

Anhang D : Symbole

A	Verstärkungsfaktor des Coulter Counters
α	Wahrscheinlichkeit eines statistischen Fehlers 1. Art
AGK	Absterbegeschwindigkeitskonstante
AIC	Informationskriterium nach Akaike
b	Ordinatenabschnitt
BP	British Pharmacopoea, Ausgabe 1973
CC	Coulter Counter
CHG	Chlorhexidingluconat
d	Durchmesser [µm]
D	Kompartiment, in das die toten Zellen eingehen
DAB 8	Deutsches Arzneibuch, 8. Ausgabe
DAC	Deutscher Arzneimittelkodex, Ausgabe 1983
e	Basis der natürlichen Logarithmen (e = 2.718)
E	Kompartiment, in dem sich die Zellen zu Beginn der Regeneration befinden
E_0	Keime zur Zeit t_0 im Kompartiment E
E(t)	Keime zur Zeit t im Kompartiment E
e(s)	Laplace-Transformierte von E(t)
Exp.Z.	Expositionszeit [min]
F	Funktionswert
f	Ableitung des Funktionswertes F
F	statistische Prüfgröße
f_j	Zahl der Freiheitsgrade des Modells mit p_j Parametern
f_k	Zahl der Freiheitsgrade des Modells mit p_{j+i} Parametern
GKZ	Gesamtkeimzahl [KZ/ml]
$GKZ_{i,j}$	GKZ der i-ten Meßreihe zum Zeitpunkt t_j
°C	Grad Celsius
h	Stunde
k	Wachstumsgeschwindigkeitskonstante der Wachstumsversuche ohne Konservierungsmittel [h^{-1}]
k_-	Absterbegeschwindigkeitskonstante [h^{-1}]
k_D	AGK im Modell III [h^{-1}]
k_i	WGK der i-ten Regenerationsbouillon [h^{-1}]

k_{ij}	Übergangsrate vom Kompartiment$_i$ in das Kompartiment$_j$
KBE	Koloniebildende Einheiten
KF	Kalibrierungsfaktor (Coulter Counter)
KM	Konservierungsmittel
Konz	Konzentration [µg/ml]
KZ	Keimzahl [KZ/ml]
KZ_0	Keimzahl zu Beginn des Experimentes
$KZ_{i,0}$	Keimzahl der i-ten Meßreihe unmittelbar nach dem Überimpfen
L	Laplace-Transformation
LKZ	Lebendkeimzahl [KZ/ml]
LKZ_0	Lebendkeimzahl zu Beginn des Experimentes
LKZ^*_0	Lebendkeimzahl, die durch Extrapolation der Wachstumskurven erhalten wurde
LKZ_D	Keime in Modell III, die in Inaktivierungsbouillon noch absterben
$LKZ_{i,0}$	LKZ der i-ten Meßreihe unmittelbar nach dem Überimpfen
$LKZ^*_{i,0}$	durch Extrapolation der Daten der Wiederanzucht erhaltene Lebendkeimzahl der i-ten Meßreihe zum Zeitpunkt des Überimpfens
$LKZ_{i,j}$	LKZ_j der i-ten Meßreihe
LKZ_V	Anzahl der Keime in Modell III, die in Inaktivierungsbouillon überleben
ln	logarithmus naturalis
m	Steigung einer Geraden
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MVZ	mittlere Verweilzeit [h]
n	Zahl der Meßwerte
N	Zahlenwert, z.B. Keimzahl
N_W	Zahl der Keime, die in die Wachstumsphase übergegangen sind
p_j	Anzahl der Parameter des j-ten Modells
p_k	Anzahl der Parameter des k-ten Modells (k = j + i)
P_i	i-ter Parameterwert des Modells
$P_{i\ min}$	i-ter Parameterwert des Modells bei minimaler SSQ
P_j	j-ter Parameterwert des Modells
$P_{j\ min}$	j-ter Parameterwert des Modells bei minimaler SSQ

Ph.Helv.	Pharmacopoea Helvetica, VI. Ausgabe
PL	Platte
r	Regressionskoeffizient
R	Kompartiment, in das lebensfähige Keime in Modell II nach Verlassen von E eingehen
R_0	Keime zur Zeit t_0 im Kompartiment R
R(t)	Keime zur Zeit t im Kompartiment W
r(s)	Laplace-Transformierte von R(t)
SSQ	Summe der Fehlerquadrate
SSQ_{Cont}	Summe der Fehlerquadrate auf der Kontur
SSQ_j	Summe der Fehlerquadrate des Modells mit p_j Parametern
SSQ_k	Summe der Fehlerquadrate des Modells mit p_{j+i} Parametern
SSQ_{min}	Minimum der Summe der Fehlerquadrate
t	Zeit [min]
$t_{0.1}$	D-Wert, die Zeitspanne, in der die Keimzahl auf 10% des Ausgangswertes reduziert wird
$t_{1\%}$	Zeitpunkt in Modell I und II, zu dem 1% der lebensfähigen Keime sich wieder in der logarithmischen Wachstumsphase befinden [min]
t_2	Generationszeit [min]
$t_{1/2}$	Halbwertszeit [min]
t_0	Zeitpunkt der KM-Zugabe zu der logarithmisch wachsenden Kultur
$t_{i,0}$	Zeitpunkt der i-ten Probeziehung aus der absterbenden Kultur [min]
$t_{i,j}$	Zeitpunkt der j-ten Keimzahlbestimmung der i-ten Kultur
t_L	untere Schwellengrenze des Coulter Counters [Ohm]
t_{lag}	Zeitspanne der Wachstumsverzögerung [min]
Temp	Temperatur [°C]
USP	United States Pharmacopoeia, XX. Ausgabe
V	Spannung [Volt]
W	Kompartiment des logarithmischen Wachstums
W_0	Keime zur Zeit t_0 im Kompartiment W
W(t)	Keime zur Zeit t im Kompartiment W
w(s)	Laplace-Transformierte von W(t)
WGK	Wachstumsgeschwindigkeitskonstante

ANHANG E : EDV-PROGRAMME

PROGRAMM : MODELL1.FTN

```
C       DAS PROGRAMM BERECHNET DIE KURVENANPASSUNG DER
C       REGENERATION IM ERSTEN MODELL
C       BENÖTIGTE UNTERPROGRAMME DSIM2,SFQNEW,LESEA
        REAL*8 P(15,15),TIME(7,20),COUNT(7,20),DIFF(7,20),
        1ABW(7,20),YBER(7,20),STEP(15),VARNAM(15),DK(7),
        2RK(7),WK(7),EQK(7),YSTAR(7),PLUS(7),R1(7),
        3R2(7),W1(7),W2(7),W3(7),FAK(7),FQ(7),ORIF,F,A,R,W
        REAL*4 FILNA1(4),DATUM,TEMP,PROZ
        INTEGER*4 ITER,IITER
        INTEGER*2 METH,KONS,K,L,KMAX,LMAX,KK
        COMMON P,STEP,VARNAM,F,ITER,IITER
        COMMON/DATEN/ TIME,COUNT,YSTAR,K
        DATA TIME/140*0./,COUNT/140*0./,DIFF/140*0./,
        1ABW/140*0./,YBER/140*0./,STEP/15*0./,DK/7*0./,
        2RK/7*0./,WK/7*0./,EQK/7*0./,YSTAR/7*0./,
        3PLUS/7*0./,FQ/7*0./
        EXTERNAL SFQNEW
        VARNAM(1) = 'DEADGK  '
        VARNAM(2) = 'REGENEGK'
        VARNAM(3) = 'EQUILIGK'
        WRITE (5,100)
100     FORMAT (' AUSWERTUNG VON REGENERATIONSVERSUCHEN MIT
        1 DER PLATTENMETHODE')
        CALL LESEA (TIME,COUNT,PLUS,FILNA1,DATUM,TEMP,PROZ,
        1ORIF,METH,KONS,KMAX,LMAX)
        WRITE (5,200)
200     FORMAT (' WERDEN ALLE KURVEN GEWÜNSCHT ? JA = 1
        1 NEIN = 2 ')
        READ (5,300) JA
300     FORMAT (I2)
```

```
      KK = 1
      IF (JA.EQ.1) GO TO 600
      WRITE (5,400)
400   FORMAT ( ' EINGABE 1. UND LETZTE KURVE ')
      READ (5,500) KK,KMAX
500   FORMAT (2I2)
600   CONTINUE
      DO 2100 K = KK,KMAX
800   FORMAT (D15.5)
900   WRITE (5,1000) K
1000  FORMAT (' BERECHNUNG DER KONSTANTEN FÜR DIE ',I2,'.
      1KURVE',/,' EINGABE SCHÄTZWERTE UND SCHRITTWEITEN ')
      DO 1400 I = 1,3
      WRITE (5,1100) I,VARNAM(I)
1100  FORMAT (1I2,'. ',A8,' : ')
      READ (5,1300,ERR=900) P(I,1),STEP(I)
1300  FORMAT (2F15.8)
1400  CONTINUE
      WRITE (5,1500)
1500  FORMAT ( ' WIEVIELE ITERATIONEN ? ')
      READ (5,1550) ITER
1550  FORMAT (I4)
      WRITE (5,1560)
1560  FORMAT ( ' NACH WIEVIEL ITERATIONEN ZWISCHENBERICHT ? ')
      READ (5,1550) IITER
      CALL DSIM2 (F,P,15,4,STEP,0,ITER,IITER,0.1D-03,SFQNEW,
      15,VARNAM)
      FQ(K) = F
      DK(K) = P(1,1)
      WK(K) = P(2,1)
      EQK(K) = P(3,1)
      DO 1600 L = 1,LMAX
      A = COUNT(K,1) * DEXP (-(DK(K)+WK(K))*TIME(K,L))
```

```
      W = WK(K)*COUNT(K,1)/(-EQK(K)-DK(K)-WK(K))
      1*DEXP(-(DK(K)+WK(K))*TIME(K,L))
      2+WK(K)*COUNT(K,1)/(DK(K)+WK(K)+EQK(K))*
      3DEXP(EQK(K)*TIME(K,L))
      IF ( COUNT(K,L).EQ.0.) GO TO 1600
      YBER(K,L) = A + W
      DIFF(K,L) = COUNT(K,L) - YBER(K,L)
      ABW(K,L) = 100. * DIFF(K,L) / COUNT(K,L)
1600  CONTINUE
      WRITE (5,1700)
1700  FORMAT (T5,'MESSWERT',T23,'BERECHNET',T41,'ABWEICHUNG')
      DO 1900 L = 1,LMAX
      IF ( COUNT(K,L).EQ.0. ) GO TO 1900
      WRITE (5,1800) COUNT(K,L),YBER(K,L),ABW(K,L)
1800  FORMAT (T1,D15.5,T19,D15.5,T37,D15.5)
1900  CONTINUE
      WRITE (5,2000)
2000  FORMAT (' NOCH NE ITERATION ? JA = 1  NEIN = 2 ')
      READ (5,300) JA
      IF (JA.EQ.1) GO TO 900
      W1(K) = WK(K)*COUNT(K,1)/(EQK(K)-DK(K)-WK(K))
      W2(K) = RK(K)*COUNT(K,1)/(DK(K)+WK(K)+EQK(K))
2100  CONTINUE
2200  WRITE (5,2300)
2300  FORMAT (2' AUSDRUCK ERWÜNSCHT ? JA = 1  NEIN = 2 ')
      READ (5,300) JA
      IF (JA.EQ.2) GO TO 3600
      OPEN (UNIT=6,NAME='SY:SP.DAT',DISP='PRINT')
      WRITE (6,2310) DATUM,FILNA1,TEMP
2310  FORMAT (/,43X,'REGENERATIONSKINETIK',//,T5,'VERSUCH VOM',
      1T21,2A4,T39,'FILENAME',T55,4A4,T78,'TEMPERATUR',T96,F5.1,
      2' GRAD CELSIUS')
      GO TO (2320,2700,3600,3600) KONS
2320  WRITE (6,2330) PROZ*10.
```

```
2330    FORMAT (T5,'KONS.MITTEL',T21,'BAC',T39,'KONZENTRATION',
        1T53,F12.8,' MG/ML')
        GO TO 2900
2700    WRITE (6,2800) PROZ*10.
2800    FORMAT (T5,'KONS.MITTEL',T21,'CHG',T39,'KONZENTRATION',
        1T53,F12.8,' MG/ML')
2900    DO 3400 K = KK,KMAX
        WRITE (6,3000) K,DK(K),WK(K),EQK(K)
3000    FORMAT (///,47X,I2,'. KURVE',//,T5,'DEADGK',T15,D10.4,
        1,' /STD',T32,'RUHEGK',T42,D10.4,' /STD',T69,
        2'WACHSGK',T79,D10.4,' /STD')
        WRITE (6,3100) FQ(K),W1(K),W2(K)
3100    FORMAT (T5,'SFQ',T15,D9.3,T32,'W1',T42,D9.3,T59,'W2',
        1T69,D9.3,///,
        2T5,'ZEIT',T23,'MESSWERT',
        3T41,'BERECHNET',T59,'DIFFERENZ',T80,'ABWEICHUNG')
        DO 3300 L = 1,LMAX
        IF ( COUNT(K,L).EQ.0. ) GO TO 3300
        WRITE (6,3200) TIME(K,L),COUNT(K,L),YBER(K,L),DIFF(K,L),
        1ABW(K,L)
3200    FORMAT (T1,D15.5,T19,D15.5,T37,D15.5,T55,D15.5,T76,D15.5)
3300    CONTINUE
3400    CONTINUE
        WRITE (5,3500)
3500    FORMAT (///)
        CALL CLOSE (6)
3600    CONTINUE
        STOP
        END
```

UNTERPROGRAMM SFQNEW.FTN

```
      DOUBLE PRECISION FUNCTION SFQNEW (P,MAX,I)
C     PROGRAMM DIENT ALS UNTERPROGRAMM ZUR REGENERATIONSANALYSE
      REAL*8 P(15,15),TIME(7,20),COUNT(7,20),DK,RK,WK,EQK,
     1YSTAR(7),A,R,W,ARW
      INTEGER*2 MAX,I,L,K,JA
      COMMON/DATEN/ TIME,COUNT,YSTAR,K
      DK = P(1,I)
      WK = P(2,I)
      EQK = P(3,I)
      SFQNEW = 0.
      DO 10 L = 1,20
      IF (COUNT(K,L).EQ.0.) GO TO 10
      A = COUNT(K,1) * DEXP (-(DK+WK)*TIME(K,L))
      W = WK*COUNT(K,1)/(-EQK-DK-WK)*DEXP(-(DK+WK)*TIME(K,L))+
     1WK*COUNT(K,1)/(DK+WK+EQK)*DEXP(EQK*TIME(K,L))
      ARW = A + W
      SFQNEW = SFQNEW +(( COUNT(K,L) - ARW ) ** 2) / ARW
10    CONTINUE
      RETURN
      END
```

PROGRAMM MODELLII.FTN

```
C       DAS PROGRAMM BERECHNET DIE KURVENANPASSUNG DER
C       REGENERATION IN MODELL II
C       BENÖTIGTE UNTERPROGRAMME DSIM2,SFQNEU,LESEA
        REAL*8 P(15,15),TIME(7,20),COUNT(7,20),DIFF(7,20),
        1ABW(7,20),YBER(7,20),STEP(15),VARNAM(15),DK(7),
        2RK(7),WK(7),EQK(7),YSTAR(7),PLUS(7),R1(7),
        3R2(7),W1(7),W2(7),W3(7),FAK(7),FQ(7),ORIF,F,A,R,W
        REAL*4 FILNA1(4),DATUM,TEMP,PROZ
        INTEGER*4 ITER,IITER
        INTEGER*2 METH,KONS,K,L,KMAX,LMAX,KK
        COMMON P,STEP,VARNAM,F,ITER,IITER
        COMMON/DATEN/ TIME,COUNT,YSTAR,K
        DATA TIME/140*0./,COUNT/140*0./,DIFF/140*0./,
        1ABW/140*0./,YBER/140*0./,STEP/15*0./,DK/7*0./,
        2RK/7*0./,WK/7*0./,EQK/7*0./,YSTAR/7*0./,
        3PLUS/7*0./,FQ/7*0./
        EXTERNAL SFQNEU
        VARNAM(1) = 'DEADGK  '
        VARNAM(2) = 'REGENEGK'
        VARNAM(3) = 'WACHSTGK'
        VARNAM(4) = 'EQUILIGK'
        WRITE (5,100)
100     FORMAT (' AUSWERTUNG VON REGENERATIONSVERSUCHEN MIT
        1 DER PLATTENMETHODE')
        CALL LESEA (TIME,COUNT,PLUS,FILNA1,DATUM,TEMP,PROZ,
        1ORIF,METH,KONS,KMAX,LMAX)
        WRITE (5,200)
200     FORMAT (' WERDEN ALLE KURVEN GEWÜNSCHT ? JA = 1
        1 NEIN = 2 ')
        READ (5,300) JA
300     FORMAT (I2)
        KK = 1
```

```
      IF (JA.EQ.1) GO TO 600
      WRITE (5,400)
400   FORMAT ( ' EINGABE 1. UND LETZTE KURVE ')
      READ (5,500) KK,KMAX
500   FORMAT (2I2)
600   CONTINUE
      DO 2100 K = KK,KMAX
      WRITE (5,700)
700   FORMAT ( ' EINGABE EXTRAPOLIERTER NULLWERT ')
      READ (5,800) YSTAR(K)
800   FORMAT (D15.5)
900   WRITE (5,1000) K
1000  FORMAT (' BERECHNUNG DER KONSTANTEN FÜR DIE ',I2,'.
      1KURVE',/,' EINGABE SCHÄTZWERTE UND SCHRITTWEITEN ')
      DO 1400 I = 1,4
      WRITE (5,1100) I,VARNAM(I)
1100  FORMAT (1I2,'. ',A8,' : ')
      READ (5,1300,ERR=900) P(I,1),STEP(I)
1300  FORMAT (2F15.8)
1400  CONTINUE
      WRITE (5,1500)
1500  FORMAT (1' WIEVIELE ITERATIONEN ? ')
      READ (5,1550) ITER
1550  FORMAT (I4)
      WRITE (5,1560)
1560  FORMAT ( ' NACH WIEVIEL ITERATIONEN ZWISCHENBERICHT ? ')
      READ (5,1550) IITER
      CALL DSIM2 (F,P,15,5,STEP,0,ITER,IITER,0.1D-03,SFQNEU,
      15,VARNAM)
      FQ(K) = F
      DK(K) = P(1,1)
      RK(K) = P(2,1)
      WK(K) = P(3,1)
      EQK(K) = P(4,1)
```

```
      DO 1600 L = 1,LMAX
      A = COUNT(K,1) * DEXP (-(DK(K)+RK(K))*TIME(K,L))
      R = RK(K)*COUNT(K,1)/(WK(K)-DK(K)-RK(K))
      1*DEXP(-(DK(K)+RK(K))*TIME(K,L))
      2+RK(K)*COUNT(K,1)/(DK(K)-WK(K)+RK(K))*
      3DEXP(-WK(K)*TIME(K,L))
      W = WK(K)*RK(K)*COUNT(K,1)*DEXP(-(DK(K)+RK(K))*TIME(K,L))
      1/((WK(K)-DK(K)-RK(K))*(-DK(K)-RK(K)-EQK(K)))
      1+WK(K)*RK(K)*COUNT(K,1)/((DK(K)+RK(K)-WK(K))*(-WK(K)-EQK(K)
      2))*DEXP(-WK(K)*TIME(K,L))+WK(K)*RK(K)*COUNT(K,1)/((DK(K)
      3+RK(K)+EQK(K))*(WK(K)+EQK(K)))*DEXP(EQK(K)*TIME(K,L))
      IF ( COUNT(K,L).EQ.0.) GO TO 1600
      YBER(K,L) = A + R + W
      DIFF(K,L) = COUNT(K,L) - YBER(K,L)
      ABW(K,L) = 100. * DIFF(K,L) / COUNT(K,L)
1600  CONTINUE
      WRITE (5,1700)
1700  FORMAT (T5,'MESSWERT',T23,'BERECHNET',T41,'ABWEICHUNG')
      DO 1900 L = 1,LMAX
      WRITE (5,1800) COUNT(K,L),YBER(K,L),ABW(K,L)
1800  FORMAT (T1,D15.5,T19,D15.5,T37,D15.5)
1900  CONTINUE
      WRITE (5,2000)
2000  FORMAT ( ' NOCH NE ITERATION ? JA = 1  NEIN = 2 ')
      READ (5,300) JA
      IF (JA.EQ.1) GO TO 900
      R1(K) = RK(K)*COUNT(K,1)/(WK(K)-DK(K)-RK(K))
      R2(K) = RK(K)*COUNT(K,1)/(DK(K)-WK(K)+RK(K))
      W1(K) = WK(K)*RK(K)*COUNT(K,1)/((WK(K)-DK(K)-RK(K))*
      1(-EQK(K)-DK(K)-RK(K)))
      W2(K) = WK(K)*RK(K)*COUNT(K,1)/((DK(K)+RK(K)-WK(K))*
      1(-WK(K)-EQK(K)))
      W3(K) =WK(K)*RK(K)*COUNT(K,1)/((DK(K)+RK(K)+EQK(K))*
      1(WK(K)-EQK(K)))
```

```
      FAK(K) = W3(K) / YSTAR(K)
2100  CONTINUE
2200  WRITE (5,2300)
2300  FORMAT ( ' AUSDRUCK ERWÜNSCHT ? JA = 1  NEIN = 2 ')
      READ (5,300) JA
      IF (JA.EQ.2) GO TO 3600
      OPEN (UNIT=6,NAME='SY:SP.DAT',DISP='PRINT')
      WRITE (6,2310) DATUM,FILNA1,TEMP
2310  FORMAT (/,43X,'REGENERATIONSKINETIK',//,T5,'VERSUCH VOM',
     1T21,2A4,T39,'FILENAME',T55,4A4,T78,'TEMPERATUR',T96,F5.1,
     2' GRAD CELSIUS')
      GO TO (2320,2700,3600,3600) KONS
2320  WRITE (6,2330) PROZ*10.
2330  FORMAT (T5,'KONS.MITTEL',T21,'BAC',T39,'KONZENTRATION',
     1T53,F12.8,' MG/ML')
      GO TO 2900
2700  WRITE (6,2800) PROZ*10.
2800  FORMAT (T5,'KONS.MITTEL',T21,'CHG',T39,'KONZENTRATION',
     1T53,F12.8,' MG/ML')
2900  DO 3400 K = KK,KMAX
      WRITE (6,3000) K,DK(K),RK(K),WK(K),EQK(K)
3000  FORMAT (///,47X,I2,'. KURVE',//,T5,'DEADGK',T15,D10.4,' /
     1STD',T32,'REGGK',T42,D10.4,' /STD',T59,'RUHEGK',T69,D10.4,
     2' /STD',T86,'WACHSGK',T97,D10.4,' /STD')
      WRITE (6,3100) FQ(K),R1(K),R2(K),W1(K),W2(K),W3(K),FAK(K)
3100  FORMAT (T5,'SFQ',T15,D9.3,T32,'R1',T42,D9.3,T59,'R2',
     1T69,D9.3,/,T5,'W1',T15,D9.3,T32,'W2',T42,D9.3,T59,'W3',
     269,D9.3,T86,'FAKTOR ZU W3 ',T102,D9.3,///,T5,'ZEIT',T23,T
     3'MESSWERT',T41,'BERECHNET',T59,'DIFFERENZ',T80,'ABWEICHUNG')
      DO 3300 L = 1,LMAX
      WRITE (6,3200) TIME(K,L),COUNT(K,L),YBER(K,L),DIFF(K,L),
     1ABW(K,L)
3200  FORMAT (T1,D15.5,T19,D15.5,T37,D15.5,T55,D15.5,T76,D15.5)
3300  CONTINUE
3400  CONTINUE
```

```
      WRITE (5,3500)
3500  FORMAT (///)
      CALL CLOSE (6)
3600  CONTINUE
      STOP
      END
```

UNTERPROGRAMM SFQNEU.FTN

```
      DOUBLE PRECISION FUNCTION SFQNEU (P,MAX,I)
C     PROGRAMM DIENT ALS UNTERPROGRAMM ZUR REGENERATIONSANALYSE
      REAL*8 P(15,15),TIME(7,20),COUNT(7,20),DK,RK,WK,EQK,
     1YSTAR(7),A,R,W,ARW
      INTEGER*2 MAX,I,L,K,JA
      COMMON/DATEN/ TIME,COUNT,YSTAR,K
      DK = P(1,I)
      RK = P(2,I)
      WK = P(3,I)
      EQK = P(4,I)
      SFQNEU = 0.
      DO 10 L = 1,20
      IF (COUNT(K,L).EQ.0.) GO TO 10
      A = COUNT(K,1) * DEXP (-(DK+RK)*TIME(K,L))
      R = RK*COUNT(K,1)/(WK-DK-RK)*DEXP(-(DK+RK)*TIME(K,L))+
     1RK*COUNT(K,1)/(DK-WK+RK)*DEXP(-WK*TIME(K,L))
      W = WK*RK*COUNT(K,1)/((WK-DK-RK)*(-DK-RK-EQK))*DEXP(-(DK+RK)
     1*TIME(K,L))+WK*RK*COUNT(K,1)/((DK+RK-WK)*(-WK-EQK))*
     2DEXP(-WK*TIME(K,L))+WK*RK*COUNT(K,1)/((DK+RK+EQK)*
     3(WK+EQK))*DEXP(EQK*TIME(K,L))
      ARW = A + R + W
      SFQNEU = SFQNEU +(( COUNT(K,L) - ARW ) ** 2) / ARW
10    CONTINUE
      RETURN
      END
```

PROGRAMM MODELLIII.FTN

```
C       DAS PROGRAMM BERECHNET DIE KURVENANPASSUNG DER
C       BERECHNUNG DER LAG-ZEIT
C       BENÖTIGTE UNTERPROGRAMME DSIM2,SSQLAG,LESEA
        REAL*8 P(15,15),TIME(7,20),COUNT(7,20),DIFF(7,20),
        1ABW(7,20),YBER(7,20),STEP(15),VARNAM(15),YD(7),
        2DK(7),YS(7),WK(7),TLAG(7),PLUS(7),
        3R2(7),W1(7),W2(7),W3(7),FAK(7),FQ(7),ORIF,F,A,R,W
        REAL*4 FILNA1(4),DATUM,TEMP,PROZ
        INTEGER*4 ITER,IITER
        INTEGER*2 METH,KONS,K,L,KMAX,LMAX,KK
        COMMON P,STEP,VARNAM,F,ITER,IITER
        COMMON/DATEN/ TIME,COUNT,K
        DATA TIME/140*0./,COUNT/140*0./,DIFF/140*0./,
        1ABW/140*0./,YBER/140*0./,STEP/15*0./,YD/7*0./,
        2DK/7*0./,YS/7*0./,WK/7*0./,TLAG/7*0./,
        3PLUS/7*0./,FQ/7*0./
        EXTERNAL SSQLAG
        VARNAM(1) = '  TOTE  '
        VARNAM(2) = 'ABST.-GK'
        VARNAM(3) = 'LEBENDE '
        VARNAM(4) = 'WACHS-GK'
        VARNAM(5) = ' T-LAG  '
        WRITE (5,100)
100     FORMAT (' AUSWERTUNG VON REGENERATIONSVERSUCHEN MIT
        1 DER PLATTENMETHODE')
        CALL LESEA (TIME,COUNT,PLUS,FILNA1,DATUM,TEMP,PROZ,
        1ORIF,METH,KONS,KMAX,LMAX)
        WRITE (5,200)
200     FORMAT (' WERDEN ALLE KURVEN GEWÜNSCHT ? JA = 1
        1 NEIN = 2 ')
        READ (5,300) JA
300     FORMAT (I2)
```

```
      KK = 1
      IF (JA.EQ.1) GO TO 600
      WRITE (5,400)
400   FORMAT ( ' EINGABE 1. UND LETZTE KURVE ')
      READ (5,500) KK,KMAX
500   FORMAT (2I2)
600   CONTINUE
      DO 2100 K = KK,KMAX
800   FORMAT (D15.5)
900   WRITE (5,1000) K
1000  FORMAT (' BERECHNUNG DER KONSTANTEN FÜR DIE ',I2,'.
     1KURVE',/,' EINGABE SCHÄTZWERTE UND SCHRITTWEITEN ')
      DO 1400 I = 1,5
      WRITE (5,1100) I,VARNAM(I)
1100  FORMAT (1I2,'. ',A8,' : ')
      READ (5,1300,ERR=900) P(I,1),STEP(I)
1300  FORMAT (2F15.8)
1400  CONTINUE
      P(5,1)=P(5,1)/60.
      STEP(5)=STEP(5)/60.
      WRITE (5,1500)
1500  FORMAT ( ' WIEVIELE ITERATIONEN ? ')
      READ (5,1550) ITER
1550  FORMAT (I4)
      WRITE (5,1560)
1560  FORMAT ( ' NACH WIEVIEL ITERATIONEN ZWISCHENBERICHT ? ')
      READ (5,1550) IITER
      CALL DSIM2 (F,P,15,6,STEP,0,ITER,IITER,0.1D-03,SSQLAG,
     15,VARNAM)
      FQ(K) = F
      YD(K) = P(1,1)
      DK(K) = P(2,1)
      YS(K) = P(3,1)
```

```
      WK(K) = P(4,1)
      TLAG(K) = P(5,1)
      DO 1600 L = 1,LMAX
      IF (TIME(K,L).GT.TLAG(K)) GO TO 700
      YBER(K,L) = YD(K)*DEXP(-DK(K)*TIME(K,L))+YS(K)
      GO TO 750
700   YBER(K,L) = YD(K)*DEXP(-DK(K)*TIME(K,L))+
      1YS(K)*DEXP(WK(K)*(TIME(K,L)-TLAG(K)))
750   IF (COUNT(K,L).EQ.0.) GO TO 1600
      DIFF(K,L) = COUNT(K,L) - YBER(K,L)
      ABW(K,L) = 100. * DIFF(K,L) / COUNT(K,L)
1600  CONTINUE
      WRITE (5,1700)
1700  FORMAT (T5,'MESSWERT',T23,'BERECHNET',T41,'ABWEICHUNG')
      DO 1900 L = 1,LMAX
      WRITE (5,1800) COUNT(K,L),YBER(K,L),ABW(K,L)
1800  FORMAT (T1,D15.5,T19,D15.5,T37,D15.5)
1900  CONTINUE
      WRITE (5,2000)
2000  FORMAT ( ' NOCH NE ITERATION ? JA = 1  NEIN = 2 ')
      READ (5,300) JA
      IF (JA.EQ.1) GO TO 900
2100  CONTINUE
2200  WRITE (5,2300)
2300  FORMAT ( ' AUSDRUCK ERWÜNSCHT ? JA = 1  NEIN = 2 ')
      READ (5,300) JA
      IF (JA.EQ.2) GO TO 3600
      OPEN (UNIT=6,NAME='SY:SP.DAT',DISP='PRINT')
      WRITE (6,2310) DATUM,FILNA1,TEMP
2310  FORMAT (/,43X,'LAG-TIME-BERECHNUNG',//,T5,'VERSUCH VOM',
      1T21,2A4,T39,'FILENAME',T55,4A4,T78,'TEMPERATUR',T96,F5.1,
      2' GRAD CELSIUS')
      GO TO (2320,2700,3600,3600) KONS
2320  WRITE (6,2330) PROZ*10.
```

```
2330  FORMAT (T5,'KONS.MITTEL',T21,'BAC',T39,'KONZENTRATION',
      1T53,F12.8,' MG/ML')
      GO TO 2900
2700  WRITE (6,2800) PROZ*10.
2800  FORMAT (T5,'KONS.MITTEL',T21,'CHG',T39,'KONZENTRATION',
      1T53,F12.8,' MG/ML')
2900  DO 3400 K = KK,KMAX
      WRITE (6,3000) K,YD(K),YS(K),DK(K),WK(K)
3000  FORMAT (///,47X,I2,'. KURVE',//,T5,'TOTE',T15,D10.4,' /ML',
      1T32,'LEBENDE',T42,D10.4,' /ML',T59,'DEADGK',T69,D10.4,'
      2/STD',T86,'WACHSGK',T97,D10.4,' /STD')
      WRITE (6,3100) FQ(K),TLAG(K)*60.
3100  FORMAT (T5,'SFQ',T15,D9.3,T32,'LAG-ZEIT',T42,D10.3
      2,///,T5,'ZEIT',T23,'MESSWERT',
      3T41,'BERECHNET',T59,'DIFFERENZ',T80,'ABWEICHUNG')
      DO 3300 L = 1,LMAX
      WRITE (6,3200) TIME(K,L),COUNT(K,L),YBER(K,L),DIFF(K,L),
      1ABW(K,L)
3200  FORMAT (T1,D15.5,T19,D15.5,T37,D15.5,T55,D15.5,T76,D15.5)
3300  CONTINUE
3400  CONTINUE
      WRITE (5,3500)
3500  FORMAT (///)
      CALL CLOSE (6)
3600  CONTINUE
      STOP
      END
```

UNTERPROGRAMM SSQLAG.FTN

```
      DOUBLE PRECISION FUNCTION SSQLAG (P,MAX,I)
C     PROGRAMM DIENT ALS UNTERPROGRAMM ZUR LAG-ZEITBERECHNUNG
      REAL*8 P(15,15),TIME(7,20),COUNT(7,20),YD,DK,YS,WK,TLAG
      INTEGER*2 MAX,I,L,K,JA
      COMMON/DATEN/ TIME,COUNT,K
      YD = P(1,I)
      DK = P(2,I)
      YS = P(3,I)
      WK = P(4,I)
      TLAG = P(5,1)
      SSQLAG = 0.
      DO 50 L = 1,20
      IF (COUNT(K,L).EQ.0.) GO TO 50
      IF (TIME(K,L).GT.TLAG) GO TO 40
      SSQLAG = SSQLAG + (COUNT(K,L)-YD*DEXP(-DK*TIME(K,L))-YS)**2
      GO TO 50
40    SSQLAG = SSQLAG + (COUNT(K,L)-YD*DEXP(-DK*TIME(K,L))-YS*DEXP
      4(WK*(TIME(K,L)-TLAG)))**2
50    CONTINUE
      RETURN
      END
```

7. LITERATUR

1) M.Grayson, Diseases of the Cornea, The C.V.Mosby Company, St.Louis, Toronto, London, 1979

2) H.B.Fedukowicz, External Infection of the Eye, Appleton-Century-Crofts, New York, 1980

3) H.Böhme, K.Hartke, Deutsches Arzneibuch, Kommentar, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 8. Ausgabe, 1978

4) British Pharmacopoeia, University Printing House, Cambridge, 1973

5) R.M.E.Richards, R.J.McBride, J.Pharm.Pharmac., 23, Suppl., 234 S, 1971

6) R.M.E.Richards, R.J.McBride, J.Pharm.Pharmac., 24, 145, 1972

7) R.M.E.Richards, J.M.E.Reary, J.Pharm.Pharmac., 24, 84 P, 1972

8) U.Feldmann, Dissertation, Techn.Hochschule Hannover, 1973

9) U.Feldmann, Wachstumskinetik, Springer-Verlag, Berlin, 1979

10) E.R.Garrett, Scand.J.Infect.Dis., Suppl.14, 54, 1978

11) E.R.Garrett, Arzneim.Forsch., 16, 1364, 1966

12) M.R.W.Brown, E.R.Garrett, J.Pharm.Sci., 53, 179, 1964

13) E.R.Garrett, G.H.Miller, J.Pharm.Sci., 54, 427, 1965

14) E.R.Garrett et al., J.Med.Chem., 9, 203, 1966

15) E.R.Garrett et al., J.Pharm.Sci., 55, 593, 1966

16) E.R.Garrett et al., J.Med.Chem., 12, 740, 1969

17) J.B.Mielck, E.R.Garrett, J.Pharm.Sci., 59, 760, 1970

18) E.R.Garrett et al., J.Pharm.Sci., 59, 1448, 1970

19) S.M.Heman-Ackah, E.R.Garrett, J.Med.Chem., 15, 152, 1972

20) E.R.Garrett, A.J.Richard, J.Pharm.Sci., 63, 884, 1974

21) A.J.Richard, E.R.Garrett, J.Pharm.Sci., 63, 894, 1974

22) E.R.Garrett et al., J.Pharm.Sci., 66, 1422, 1977

23) S.M.Heman-Ackah, J.Pharm.Sci., 64, 1621, 1975

24) E.R.Garrett, O.K.Wright, J.Pharm.Sci., 56, 1576, 1967

25) A.J.Richard, E.R.Garrett, J.Pharm.Sci., 63, 894, 1974

26) E.R.Garrett, C.M.Won, J.Pharm.Sci., 62, 1666, 1973

27) E.R.Garrett, J.K.Lewis, J.Pharm.Sci., 64, 1936, 1975

28) S.M.Heman-Ackah, J.Pharm.Sci., 63, 1077, 1974

29) S.M.Heman-Ackah, J.Pharm.Sci., 64, 1612, 1975

30) S.M.Heman-Ackah, E.R.Garrett, J.Pharm.Sci., 61, 545, 1972

31) C.M.Won, E.R.Garrett, J.Pharm.Sci., 62, 1087, 1973

32) E.R.Garrett, M.R.W.Brown, J.Pharm.Pharmac., 15, Suppl., 185 T, 1963

33) E.R.Garrett, Arzneim.Forsch., 16, 1364, 1966

34) J.K.Seydel, E.Wempe, Arzneim.Forsch., 30, 298, 1980

35) F.H.Dost, Grundlagen der Pharmakokinetik, Georg Thieme, Stuttgart, 1. Aufl., 1953

36) A.Rescigno, G.Segre, Drug and Tracer Kinetics, Blaisdell Publishing Company, Waltham Mass., 1.Aufl., 1966

37) W.B.Hugo, J.H.S.Forster, J.Pharm.Pharmac., 16, Suppl., 124 T, 1964

38) H.S.Bean, J.Soc.Chem., 23, 703, 1972

39) D.J.G.Davies, J.appl.Bac., 44, Sxix, 1978

40) A.E.Elkhouly, R.T.Yousef, J.Pharm.Sci., 63, 681, 1974

41) C.D.Freke, D.Haggie, J.Food.Prot., 44, 699, 1981

42) W.B.Hugo, Pharm.Microbiology, Blackwell Scientific Publications Cambridge, 1977

43) D.Wiseman, J.Pharm.Pharmac., 16, Suppl., 56 T, 1964

44) F.M.Harold et al., Biochim.biophys.Acta, 183, 129, 1969

45) D.C.Daltrey, W.B.Hugo, Microbios, 11, 113, 1974

46) W.B.Hugo et al., J.Pharm.Pharmac., 18, 569, 1966

47) J.J.Frederick, Antimicrob.Ag.Chemoth., 6, 712, 1974

48) W.A.Hamilton, Inhibition and Destruction of the Microbial Cell, W.B.Hugo, Academic Press, London, 1971

49) R.M.E.Richards, R.H.Cavill, J.Pharm.Sci., 65, 76, 1976

50) R.M.E.Richards, R.H.Cavill, J.Pharm.Pharmac., 28, 935, 1976

51) R.M.E.Richards, R.H.Cavill, Microbios, 26, 85, 1979

52) M.R.W.Brown, R.M.E.Richards, J.Pharm.Pharmac., 16, Suppl., 41 T, 1964

53) K.V.Thimann, Das Leben der Baterien, Gustav Fischer Verlag, Erfurt, 1964

54) K.Domagk, Dtsch.med.Wochenz., 61, 250, 1935

55) J.J.Jandolo, Z.J.Ordal, J.Bactèriol., 91, 134, 1966

56) M.T.Nadir, P.Gilbert, J.appl.Bacteriol., 52, 111, 1982

57) A.Hurst et al., Can.J.Microbiol., 22, 677, 1976

58) A.Hurst et al., J.Bacteriol., 116, 901, 1973

59) G.A.Prentice, L.F.L.Clegg, J.appl.Bacteriol., 37, 501, 1974

60) M.S.U.Chowdhury et al., Appl.Environ.Microbiol., 32, 172, 1976

61) E.Wiesmann, Medizinische Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl., 1978

62) Coulter Counter Modell ZB Manual, 6. Aufl., 1979

63) Coulter Counter Manual, Counting of Biological Material, 23, 1980

64) U.S.Pharmacopeia, XX.Revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 1980

65) K.H.Wallhäusser, Sterilisation-Desinfektion-Konservierung, Springer Verlag, Berlin, 2.Aufl., 1978

66) M.R.W.Brown, R.M.E.Richards, J.Pharm.Pharmac., 16, Suppl., 41T, 1964

67) R.Dolder, F.S.Skinner, Ophtalmica, 3.Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1983

68) A.F.Winder et al., Lancet, 2, 37, 1980

69) R.M.E.Richards, J.Pharm.Sci., 67, 380, 1978

70) M.R.W.Brown, J.Pharm.Sci., 68, 147, 1979

71) D.A.Norton, J.Pharm.Pharmacol., 26, 841, 1974

72) D.D.Heard, J.Pharm.Pharmac., 20,505, 1968

73) M.R.W.Brown, R.M.E.Richards, J.Pharm.Pharmac., 16, Suppl., 51T, 1964

74) W.R.L.Brown, A.H.Thomas, J.Pharm.Pharmac., 18, Suppl., 42S, 1966

75) D.Krüger, G.Zimmermann, Pharm.Ind., 34, 351, 1975

76) M.Spiegel, La Place Transforms, McGraw Hill, N.Y., 1965

77) J.A.Nelder, R.Mead, The Computer Journal, 7, 308, 1965

78) A.Pethö, R.D.Noble, Residence Time Distribution Theory in Chemical Engeneering, Verlag Chemie, Weinheim, 1982

79) H.G.Boxenbaum, S.Riegelman, R.M.Elashoff, J.Pharmacokin. Biopharm., 2, 163, 1974

80) K.Yamaoka et al. J.Pharmacokin.Biopharm., 6, 165, 1978

81) C. Daniel, F.S.Wood, Fitting Equations to Data, Wiley, New York, 1971

82) R.Süverkrüp, Habilitationsschrift, Bonn, 1981

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn im Februar 1981 begonnen und im Dezember 1983 abgeschlossen.

Herrn Privatdozent Dr. R. Süverkrüp, auf dessen Anregung und unter dessen Leitung die Arbeit entstand, danke ich herzlich für die stets gewährte Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und seine ständige Bereitschaft, über die anfallenden Probleme zu diskutieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Müller, Direktor des Institutes für Pharmazeutische Technolgie der Universität Bonn, für die Förderung dieser Arbeit und sein stetes Interesse.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Wiedemann, Leiter des Instituts für Pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn, danken für seine großzügige Unterstützung der Arbeit mit Substanzen und Geräten, die zur Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen notwendig waren,

sowie Frau R. Zigann, Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Mikrobiologie, für die freundliche Einweisung in die Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Ferner möchte ich ihr und allen Mitarbeitern des Instituts für die ständige Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bedanken, die sie mir bei verschiedenen Fragen gewährt haben.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Frau E. Mettbach für die stetige Hilfsbereitschaft bei der Herstellung von Nährbouillons und Agar.

Auch Herrn M. Casper möchte ich für seinen Einsatz danken, den er bei Problemen mit der EDV-Anlage bewiesen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann. Ohne seine selbstlose Unterstützung hätte ich die Arbeit nicht durchführen können.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

Glombitza, Frahm, Jäger, Kalbhen, Karzel, Kating, Müller, Pachaly, Reimann, Roth, Wiedemann, Zilliken, Zymalkowski

Lebenslauf

Name	Ursula Hedwig Wallraf-Losch
Geburtsdatum	27. September 1949
Geburtsort	Köln
Eltern	Franz-Josef Wallraf, Apotheker
	Elisabeth Wallraf, geb. Dietlein, Kindergärtnerin
Familienstand	verheiratet seit dem 28. März 1980 mit
	Dipl.Chem. Dr. rer. nat. Rainer Losch
Schulbildung	1956 - 1960 Volksschule Cäsarstraße, Köln 51
	1960 - 1964 Irmgardisschule, Köln 51
	1964 - 1968 Neusprachl. Mädchengymnasium, Köln 21
Abitur	5. Juni 1968 in Köln
Praktikum	4/69 - 5/70 Apotheke am Zoo, Köln 60
	5/70 - 3/71 Apotheke am Römerplatz, Bad-Godesberg
Vorexamen	9. März 1971 in Köln
Studium	SS 73 - WS 76/77 Pharmaziestudium, Bonn
Staatsexamen	28. März 1977
Approbation	28. September 1977
Promotion	Beginn Februar 1981, Institut für Pharm. Technolgie
Berufstätigkeit	4/77 - 4/78 Punkt Apotheke, Köln 30
	5/78 - 1/81 Troponwerke, Köln 80
	2/81 - 5/83 Universität Bonn, Pharm.Technologie
	ab 15. Mai 1983, St. Katharinen Hospital, Frechen